

PODRIDÃO NEGRA DA VIDEIRA

Caracterização de uma coleção de isolados de *Phyllosticta ampellicida* obtidos a partir de materiais vitícolas

Filipa Alexandra Lopes de Jesus Canaveira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agronómica – Proteção de Plantas

Orientador: Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Co-orientador: Mestre Teresa Margarida da Silva Nascimento

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões Oliveira, Professora Associada com
Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Paula Ferreira Ramos, Professora Auxiliar do(a) Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa

Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar do(a) Instituto
Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Investigadora Cecília Rego e à Eng^a Teresa Nascimento pelo acompanhamento, ensinamentos e pela compreensão ao longo deste trabalho.

Ao Eng^o Pedro Reis, obrigada por toda a ajuda e pela paciência.

Aos meus amigos e familiares, obrigada pelo apoio, compreensão e força para me fazerem ir em frente mesmo quando parecia quase impossível.

Ao Miguel que me apoiou nos momentos difíceis e me “empurrou” para ir seguindo em frente.

Aos meus pais que me apoiaram e me ajudaram a alcançar esta meta.

Pai: foi o pensamento em ti que me fez ter a força para chegar ao final desta etapa. Obrigada por tudo!

RESUMO

Phyllosticta ampellicida é um fungo nativo da América do Norte responsável pela doença da videira designada por podridão negra ou “black rot” na língua inglesa. Este patogéneo pode causar estragos nos tecidos verdes da planta e nos cachos, afetando a produção e a qualidade do vinho e, conseqüentemente, causando prejuízos no sector vitivinícola. Devido a uma crescente preocupação dos viticultores portugueses mostrou-se importante realizar a caracterização morfológica, cultural e molecular de uma coleção de 30 isolados portugueses obtida ao longo de vários anos (2011 a 2013), em diversas regiões vitícolas e a partir de diferentes castas em conjunto com 13 isolados recebidos de vários países da Europa, nomeadamente, Alemanha, Itália, Hungria e Luxemburgo e ainda um isolado recebido do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), como sendo *Phyllosticta ampellicida*, posteriormente reclassificado como *Phyllosticta parthenocissi*. As características morfológicas, as dimensões dos conídios, as temperaturas cardiais do crescimento micelial e a variabilidade genética intraespecífica (Inter-Simple Sequence Repeat - ISSR) foram estudadas bem como a relação com a idade dos isolados, as castas de que foram obtidos e a origem geográfica. Os resultados dos estudos morfoculturais e de temperatura confirmaram a identidade dos isolados em estudo e revelaram a existência de pequenas diferenças entre isolados, confirmadas pela análise molecular efetuada. Os testes de patogenicidade de um grupo de isolados foram realizados em videiras da casta Fernão Pires mantidas em estufa de campo. A totalidade dos isolados de *P. ampellicida* testados revelou ser patogénica para a videira contudo, não foi possível estabelecer uma relação entre a virulência e a idade dos isolados, a casta de que foram obtidos ou a proveniência nacional ou europeia.

Palavras-chave: podridão negra, patogenicidade, *Phyllosticta ampellicida* (*Guignardia bidwelli*), variabilidade genética (ISSR), *Vitis vinifera*

ABSTRACT

Phyllosticta ampellicida is a fungus native to North America and is responsible for the grapevine disease commonly known as black rot. This pathogen can cause damage to all expanding green tissues and to the clusters of grapevines, affecting both grape production and wine quality and consequently causing substantial losses to the viticulturist sector. Due to an increasing concern amongst Portuguese viticulturists it is of the utmost importance to morphological, cultural and molecular characterize a collection of Portuguese isolates obtained during several years (2011 to 2013), in different cultivars and grape growing regions. Thirty Portuguese isolates and thirteen isolates received from several European countries, namely Germany, Italy, Hungary, and Luxembourg, and also an isolate received from Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) as *Phyllosticta ampellicida* but later re-identified as *Phyllosticta parthenocissi* were used in the present study.

In this work, characterization of a collection of *Phyllosticta ampellicida* isolates obtained from wine-growing materials, the morphological characteristics, conidia dimension, optimum growth temperatures and the genetic intraspecific variability, were assessed as well as the relation between the year of collection of the isolates, the cultivar from where they were obtained and their geographic origin. Morphocultural and temperature results confirmed the identity of the isolates under study, revealing also small differences between isolates which were confirmed by molecular analysis using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). Pathogenicity of a selected group of isolates was tested on grapevine plants (cv. Fernão Pires) kept on a greenhouse, showing that all the *P. ampellicida* isolates were pathogenic towards grapevine, although it was not possible to establish a relation between virulence and the year of collection of the isolates, the cultivar from which they were obtained or their geographic origin.

Keywords: black rot, pathogenicity, *Phyllosticta ampellicida* (*Guignardia bidwelli*), genetic variability (ISSR), *Vitis vinifera*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE QUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	2
1.2. AGENTE CAUSAL.....	3
1.3. BIOLOGIA	5
1.4. SINTOMATOLOGIA EM VIDEIRA	8
1.5. MEIOS DE LUTA.....	10
1.5.1. Luta cultural	10
1.5.2. Luta química	11
1.5.3. Luta biológica	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1. CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE PHYLLOSTICTA AMPELICIDA	15
2.1.1. Isolados	15
2.1.2. Características culturais e morfológicas.....	16
2.1.3. Influência da temperatura no crescimento micelial	17
2.1.4. Caracterização molecular dos isolados.....	17
2.1.4.1. Condições de cultura dos isolados, extração e quantificação de DNA.....	17
2.1.4.2. Análise da variabilidade dos isolados por ISSR-PCR	18
2.2. DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE PHYLLOSTICTA AMPELICIDA EM VIDEIRA.....	20
2.2.1. Obtenção de material vegetal	20
2.2.2. Produção de inóculo, inoculação e condições de inoculação e parâmetro avaliado.....	20

2.2.3.	Reisolamentos.....	22
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.1.	CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA	23
3.2.	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL	27
3.3.	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POR ISSR-PCR.....	31
3.4.	PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE PHYLLOSTICTA AMPELICIDA EM VIDEIRA	34
3.4.1.	Sintomas observados	34
3.4.2.	Área das necroses nos pânpanos.....	34
3.4.3.	Reisolamentos.....	36
4.	CONCLUSÕES	38
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
6.	ANEXOS	50
	Anexo 1 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 10°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).....	50
	Anexo 2 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 15°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).....	51
	Anexo 3 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 20°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).....	52
	Anexo 4 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 25°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).....	53
	Anexo 5 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 30°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).....	54
	Anexo 6 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 35°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).....	55

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1 – Classificação taxonómica de <i>Phyllosticta ampellicida</i> (Englem.) Aa.	3
Quadro 1.2 – Sinonímia da nomenclatura de <i>Phyllosticta ampellicida</i> (estado assexuado e sexuado).	4
Quadro 1.3 – Substâncias ativas autorizadas em Portugal para o combate da podridão negra.	13
Quadro 2.1 – Identificação da coleção de isolados de <i>Phyllosticta ampellicida</i> em estudo: designação adotada (referência original), ano, órgão da videira, casta, local de colheita (concelho) e País.	15
Quadro 2.2 – Programa de amplificação utilizado para os iniciadores (GA) ₈ YT, (AG) ₈ YT e HVH(TG) ₇	19
Quadro 2.3 – Programa de amplificação utilizado para o iniciador (CAG) ₅	19
Quadro 3.1 – Características culturais de isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. em PDA, ao fim de 10 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25±1°C.	24
Quadro 3.2 – Características biométricas dos conídios de 43 isolados de <i>Phyllosticta ampellicida</i> (Gb) e um de <i>Phyllosticta parthenocissi</i> em meio de PDA, após dez dias de incubação, à temperatura de 25±1°C e na obscuridade.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ciclo biológico de <i>Phyllosticta ampellicida</i>	7
Figura 1.2 – Relação entre a temperatura e a duração da humectação das folhas necessária à infecção das folhas de videira por <i>Phyllosticta ampellicida</i>	8
Figura 1.3 – Lesões alongadas nos pecíolos de videira.	9
Figura 1.4 – Lesões acastanhadas nos lançamentos de videira.	9
Figura 1.5 – Manchas castanhas em folhas de videira.	9
Figura 1.6 – Lesões de podridão negra com picnídios em folhas de videira.....	9
Figura 1.7 – Bagos com manchas em depressão com uma coloração castanho-rosada.	9
Figura 1.8 – Bagos mumificados de videira.	9
Figura 1.9 – Bagos enrugados com picnídios.....	10
Figura 2.1 – Método de inoculação utilizado: ferida nos pâmpanos (a, b); inoculação com o disco micelial de <i>Phyllosticta ampellicida</i> (c); colocação de algodão e “Parafilm” em redor do local de inoculação (d, e).	21
Figura 2.2 – Aspeto geral do ensaio de patogenicidade: videiras da casta Fernão Pires, mantidas durante três meses em estufa de campo, sob condições de temperatura diurna de 24±5°C e temperatura noturna de 18°C, e aproximadamente 12 horas de luz solar.	22
Figura 3.1 – Culturas de <i>Phyllosticta ampellicida</i> , em meio PDA, ao fim de 10 dias sob condições de obscuridade e temperatura de 25±1°C. Em cima: face superior. Em baixo: face inferior. a e b, Gb1; c e d, Gb10; e e f, Gb9; g e h, Gb16; i e j, Gb121; k e l, Gb125.....	25
Figura 3.2 – Conídios de <i>Phyllosticta ampellicida</i> em PDA, ao fim de dez dias, com fotoperíodo de 12 horas e à temperatura de 25±1°C. a, Gb1; b, Gb123.....	27
Figura 3.3 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 10°C.	27
Figura 3.4 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 15°C.	28
Figura 3.5 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 20°C.	28
Figura 3.6 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 25°C.	29
Figura 3.7 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 30°C.	29

Figura 3.8 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 35°C.	30
Figura 3.9 – Curvas de crescimento obtidas para o conjunto de 44 isolados de <i>Phyllosticta</i> spp. para as diferentes temperaturas estudadas.	31
Figura 3.10 – Dendrograma resultante da análise de perfis de ISSR-PCR de 41 isolados de <i>Phyllosticta ampellicida</i> , produzido por UPGMA sobre uma matriz de similaridade. Em cada nó representam-se os valores percentuais de “bootstrap”; GB, isolados de <i>Phyllosticta ampellicida</i> ; Gb125 – isolado de <i>Phyllosticta parthenocissi</i>	33
Figura 3.11 – Necroses observadas nos pânpanos inoculados com isolados de <i>Phyllosticta ampellicida</i> no estudo de patogenicidade.	34
Figura 3.12 – Área das necroses produzidas nos jovens lançamentos das videiras da casta Fernão Pires inoculadas com os 43 isolados de <i>Phyllosticta ampellicida</i> , um de <i>Phyllosticta parthenocissi</i> (Gb125) e a testemunha. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD). Em abcissas, os isolados sombreados a amarelo são isolados nacionais e o sombreado a rosa, o isolado de <i>Phyllosticta parthenocissi</i>	35
Figura 3.13 – Percentagens médias de reisolamentos, obtidas a partir de plantas de videira da cultivar Fernão Pires inoculadas com 24 isolados de <i>Phyllosticta ampellicida</i> , um de <i>Phyllosticta parthenocissi</i> e a testemunha.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands

DNA – Desoxyribonucleic Acid

dNTP – Desoxirribonucleotidos trifosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat

mm – milímetros

PCR – Polimerase Chain Reaction

PDA – Potato Dextrose Agar

s.a. – substância ativa

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

UPGMA – Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages

1. INTRODUÇÃO

A podridão negra da videira é causada pelo fungo *Phyllosticta ampellicida* (Englem.) Aa, sinónimo de *Phoma uvicola* Berck & Curtis.

É uma doença originária da América do Norte, introduzida na Europa, aquando da importação de videiras americanas contaminadas pelo patógeno, nos finais do séc. XIX (Miller, 1968; Gessler *et al.*, 2005). Na Europa, a sua primeira identificação foi realizada por Viala e Ravaz em 1885 quando o patógeno foi isolado em “Vallée de l’Hérault,” no Sul de França (Hesler *et al.*, 1917; Galet, 1977; Molitor e Beyer, 2014) e em 1886 foi descrito em detalhe (Viala e Ravaz, 1886).

Os principais hospedeiros são as espécies de *Vitis*, *V. vinifera*, *V. arizonica*, *V. labrusca*, *V. rotundifolia*, entre outras (van der Aa, 1973). No entanto, pode também afetar outros géneros dentro da família *Vitaceae*, tais como, *Parthenocissus*, *Ampelopsis* e *Cissus* (van der Aa, 1973; Luttrell, 1974; Farr *et al.*, 1989).

A doença apresenta larga distribuição geográfica e é favorecida onde as condições meteorológicas, na fase de desenvolvimento vegetativo da videira, são de humidade relativa e temperatura elevadas (Dubos, 1999), ou seja, nas regiões com precipitação em abundância na primavera e no início do verão (Jermini e Gessler, 1996; Rego e Oliveira, 2007).

O fungo tem a capacidade de infetar e colonizar todos os órgãos verdes e em crescimento da videira (Ramsdell e Milholland, 1988; Kuo e Hoch, 1996) porém, são os estragos nos cachos que podem causar os maiores prejuízos, reduzindo de forma drástica a quantidade e a qualidade dos vinhos obtidos a partir de uvas infetadas (Scribner, 1886; Ferrin e Ramsdell, 1977, 1978; Ellis *et al.*, 1986; Ramsdell e Milholland, 1988; Funt *et al.*, 1990; Gadoury, 1993). Se não forem utilizados meios de luta adequados, a produção pode ser afetada de forma drástica (Hoffman *et al.*, 2002). Os estragos nos cachos devido à doença podem chegar aos 80% (Jermini e Gessler, 1996; Harms *et al.*, 2005); em vinhas severamente atacadas estes podem atingir os 100% da produção (Rinaldi *et al.*, 2013b). O controlo da doença deve realizar-se todos os anos, mesmo naqueles em que os estragos são baixos, de forma a reduzir o inóculo potencial para o ano seguinte (Hoffman e Wilcox, 2002).

As castas apontadas como mais sensíveis são: Alicante Bouschet, Baco Noir, Cabernet, Carignan, Chardonnay, Grenache, Merlot blanc, Pinot Blanc, Pinot Noir, Riesling, Sauvignon, Semillon, Syrah e Ugni-blanc (Dubos, 1999; Kong, 2012).

O presente trabalho pretende fazer a caracterização cultural, morfológica e molecular de isolados de *Phyllosticta ampellicida* obtidos em Portugal, Itália, Hungria, Alemanha e Luxemburgo e compará-los de acordo com a sua origem geográfica. Pretende-se, ainda, determinar a temperatura ótima de crescimento dos isolados e realizar testes de patogenicidade *in vivo* de modo a avaliar a virulência dos isolados da coleção.

1.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O patógeno da podridão negra é nativo da América do Norte (Hoffman *et al.*, 2002). Em 1804, em Kentucky, foi feita pela primeira vez a descrição dos estragos causados por esta doença (Reddick, 1911), mais tarde, em 1848 foi detetada em Ohio onde provocou estragos severos e, em 1867, em vários estados ocidentais dos Estados Unidos da América (Scribner, 1886). A partir desta data foram sendo documentados estragos regulares em diversos estados (Scribner, 1886).

A introdução da doença noutras regiões do Mundo, tais como na América do Sul e na Europa deverá ter ocorrido através da importação de material de propagação vegetativa contaminado (Ramsdell e Milholland, 1988).

Na Europa, a sua primeira descrição foi feita por Viala e Ravaz em 1885, quando o patógeno foi detetado no Sul de França (Molitor e Beyer, 2014). Daí a doença espalhou-se para outras regiões vitícolas europeias, tais como, Alemanha e Itália (Reddick, 1911).

Apesar de assinalada na Alemanha na década de 30 do século passado (Molitor e Beyer, 2014), só no final do séc. XX é que a doença se torna preocupante, tendo ocorrido estragos avultados com a destruição de 30 a 80% dos cachos (Harms *et al.*, 2005). Na Suíça, em 1988, ocorreram estragos avultados e o patógeno foi identificado pela primeira vez no Sul deste país (Pezet e Jermini, 1989).

A incidência da doença aumentou no início do séc. XXI, tendo sido assinalada em diferentes regiões da Alemanha e da Suíça, assim como, na Áustria, no Luxemburgo (Rinaldi *et al.*, 2013a) e na Roménia (Tomoiağa e Comsa, 2010).

Não sendo uma doença típica de climas mediterrânicos, pois é favorecida por temperaturas e humidade relativa elevadas (T 27°C; HR 90%) (Dubos, 1999), não era considerada uma doença chave da videira, contudo, em 2010, é detetada em países de clima mediterrânico como, por exemplo, Itália (Rinaldi *et al.*, 2013b). De acordo com Rinaldi *et al.* (2013a), esta disseminação poderá ter acontecido devido ao aumento do número de vinhas abandonadas,

à alteração dos fungicidas utilizados na vinha ou à alteração nos intervalos de aplicação dos mesmos. Outra hipótese proposta é que a reemergência da doença e a ocorrência em países onde era rara ou nula, pode ser devida às alterações climáticas globais, sendo o patógeno considerado uma “espécie invasora” (Harms *et al.*, 2005).

Em Portugal, em 2004, os sintomas da doença em folhas foram observados pela primeira vez em reduzido número de parcelas na região da Bairrada (Rego e Oliveira, 2007). Posteriormente, no período entre 2008 e 2010 ocorreram elevados estragos e prejuízos nesta região (Sofia e Neves, 2012). Na região do Dão, a doença ocorria pontualmente mas nunca sobre os cachos, só em 2009 é que ocorreu uma manifestação grave e repentina sobre estes (Sofia e Neves, 2012).

A emissão de circulares de Avisos Agrícolas relativas a esta doença ocorreu pela primeira vez em 2009 nas regiões da Bairrada e do Dão e em 2012 já eram emitidas também no Entre Douro e Minho (Prates, 2012). A partir desta data outras regiões começaram a emitir avisos para esta doença.

1.2. AGENTE CAUSAL

O agente causal da podridão negra é *Phyllosticta ampellicida* (Englem.) Aa (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz no estado sexuado).

A descrição do fungo foi feita pela primeira vez por Engelman em 1861 que o denominou de *Naemospora ampellicida* “basionym” (Zhang *et al.*, 2013). De acordo com o “Mycobank da International Mycological Association” (<http://www.mycobank.org/MB/320312>), a classificação taxonómica é a que consta no Quadro 1.1.

Quadro 1.1 – Classificação taxonómica de *Phyllosticta ampellicida* (Englem.) Aa.

Categorias	Taxa
Reino	Fungi
Divisão	Ascomycota
Sub-divisão	Pezizomycotina
Classe	Dothideomycetes
Ordem	Botryosphaerales
Família	Botryosphaeriaceae
Género	<i>Phyllosticta</i>
Espécie	<i>Phyllosticta ampellicida</i>

Até à última descrição como *P. ampellicida* o fungo possuiu diferentes sinónimos como representado no Quadro 1.2.

Quadro 1.2 – Sinonímia da nomenclatura de *Phyllosticta ampellicida* (estado assexuado e sexuado). (Species Fungorum: <http://www.speciesfungorum.org>)

Sinónimos do estado assexuado

- =*Naemospora ampellicida* Engelm., Trans. St. Louis Acad. Sci.: 165 (1863)
 - =*Septoria viticola* Berk. & M.A. Curtis
 - =*Phoma ustulata* Berk. & M.A. Curtis, Grevillea 2 (18): 82 (1873)
 - =*Depazea labruscae* Engelm., Trans. St. Louis Acad. Sci., J. Proc.: 215 (1877)
 - =*Phoma uvicola* var. *labruscae* Thüm., Die Pilze des Weinstockes: 16 (1878)
 - =*Phyllosticta viticola* Thüm., Die Pilze des Weinstockes: 188 (1878)
 - =*Phyllosticta labrusca* Thüm., Die Pilze des Weinstockes: 189 (1878)
 - =*Phyllosticta ampelopsidis* Ellis & G. Martin, Journal of Mycology 2 (2): 14 (1886)
 - =*Phyllostictina clemensae* Petr., Annales Mycologici 26 (5-6): 441 (1928)
-

Sinónimos do estado sexuado:

- =*Botryosphaeria bidwellii* (Ellis) Petr., Sydowia 11: 440 (1958)
 - =*Carlia bidwellii* (Ellis) Prunet, Rev. Gén. Bot.: 127 (1989)
 - =*Carlia bidwellii* (Ellis) Magnus, Bull. Trimestriel Soc. Mycol. France: 63 (1892)
 - =*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz, Bulletin de la Société Mycologique de France 8: 63 (1892)
 - =*Laestadia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz, Progresso agric. vitic.: 492 (1888)
 - =*Phyllachorella bidwellii* (Ellis) Theiss.,
 - =*Physalospora bidwellii* (Ellis) Sacc., Sylloge Fungorum 1: 441 (1882)
 - =*Sphaerella bidwellii* (Ellis) Ellis, Cat. Plants New Jersey: 522 (1890)
 - =*Sphaeria bidwellii* Ellis, Bulletin of the Torrey Botanical
-

De acordo com a “Amsterdam Declaration Fungal Nomenclature” (Hawksworth *et al.*, 2011) e o novo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Melbourne Code, Mc Neill *et al.*, 2011), apenas um único nome deve designar e ser adotado para cada fungo. No caso particular do agente causal da podridão negra foi escolhida a designação mais antiga, *Phyllosticta ampellicida*, em detrimento de *Guignardia bidwellii* (Glienke *et al.*, 2011; Sultan *et al.*, 2011; Wilkee *et al.*, 2011, 2013; Wong *et al.*, 2012). Contudo, nos últimos anos, diversos autores prosseguiram com a designação de *G. bidwellii* (Miessner *et al.*, 2011; Rex *et al.*, 2011; Sosnowski *et al.*, 2012; Molitor *et al.*, 2012; Wicht *et al.*, 2012). Nesta tese optou-se pela designação atual de *Phyllosticta ampellicida* com base na relevância do estado assexuado no ciclo biológico da doença em Portugal.

Em cultura, o fungo tem crescimento lento e micélio cinzento-esverdeado onde, mais tarde, se diferenciam as frutificações, os picnídios. Os picnídios, são estruturas subepidérmicas solitárias, uniloculares, globosas a subglobosas, com 90-135 µm de diâmetro, ligeiramente papiladas e com ostíolo diminuto. Os esporos formados nos picnídios, os picnósporos ou conídios, são unicelulares, hialinos, ovoides, elipsoides ou globosos; quando são jovens podem ser ligeiramente clavados com base truncada e a sua extremidade é, ocasionalmente, achatada. São gotulados, com um vacúolo central e com apêndice apical hialino e existe uma mucilagem a envolvê-los. Podem medir 7,2 - (8,8) - 10,0 x 5,7 - (6,1) - 7,2 µm de comprimento e largura, respetivamente (Reddick, 1911; Kuo e Hoch, 1995; Rego e Oliveira, 2007).

As peritecas são estruturas negras, esféricas, com 130-230 µm, ostioladas, sem paráfises e com ascos cilíndricos, clavados, bitunicados que contêm oito ascósporos. Estes são unicelulares, hialinos, elipsoidais a ovoides (van der Aa, 1973; Ellis, 2008; Kong, 2012). Os ascósporos podem medir entre 10,6 - 18,4 x 4,8 - 9,0 µm de comprimento e largura, respetivamente. A produção de ascocarpos em cultura *in vitro* (Jailloux, 1992) demonstrou o homotalismo do fungo.

1.3. BIOLOGIA

Em muitos países, o ciclo de vida de *P. ampelícida*, segue o padrão normal que se conhece para os fungos ascomicetas, em que se diferenciam as peritecas nos órgãos da planta infetados no decurso do inverno do ano anterior. Porém, em Portugal, estas estruturas ainda não foram detetadas, admitindo-se que o ciclo de vida do patógeno seja assegurado somente pelo estado assexuado (Rego e Oliveira, 2007).

Os picnídios e peritecas diferenciam-se em bagos mumificados e nos cancros nas varas, constituindo formas de hibernação da doença na vinha (Hoffman e Wilcox, 2002). Destas frutificações vão ser libertados os esporos na primavera e no verão. Quando ocorre a precipitação (Ferrin e Ramsdell, 1978; Ellis *et al.*, 1986) necessária para a sua germinação e infeção (Spotts, 1977b).

Das peritecas são libertados os ascósporos quando ocorre precipitação igual ou superior a 0,3 mm (Ferrin e Ramsdell, 1977) e temperaturas de 20°C (Gadoury *et al.*, 1996), na época de desenvolvimento vegetativo (Rinaldi, 2015). A maior libertação de ascósporos acontece por altura da floração da videira (Ferrin e Ramsdell, 1977; Jermini e Gessler, 1996) e os ascósporos são dispersos pelo vento (Janex-Fravre *et al.*, 1996). Estes, para germinarem,

necessitam de 6 horas a 27°C (temperatura ótima de germinação) (Rinaldi, 2015). As primeiras infecções causadas por ascósporos podem ser contínuas se o tempo decorrer chuvoso e a temperatura não ultrapassar os 32°C (Dubos, 1999).

Os ascósporos que são libertados a partir de bagos infetados e mumificados no ano anterior (Ferrin e Ramsdell, 1978) são considerados a principal fonte de inóculo primário (Ferrin e Ramsdell, 1977, 1978) que irá infetar as folhas jovens (Ferrin e Ramsdell, 1978).

Apesar de os ascósporos serem considerados a maior fonte de inóculo primário, os conídios libertados dos picnídios, que hibernaram em bagos mumificados e em cancrios nas varas infetadas (Scribner e Viala, 1888; Becker e Pearson, 1996), podem também contribuir para estas primeiras infecções (Hoffman e Wilcox, 2002). As infecções primárias causadas por conídios provenientes de picnídios que se diferenciaram nas folhas deixadas na videira ou no solo e que não foram completamente decompostas, podem igualmente ocorrer se os invernos não forem muito severos (Kuo e Hoch, 1996). No entanto, tipicamente, eles são considerados fonte das infecções secundárias (Hoffman e Wilcox, 2002).

Segundo Ferrin e Ramsdell (1978), os conídios são os principais responsáveis pela rápida disseminação da doença. Porém, outros estudos sugerem que as infecções nos bagos são causadas principalmente por ascósporos e que, as infecções secundárias causadas por picnídios, formados nas manchas das folhas ou em necroses nos sarmentos e pecíolos, não são relevantes para a disseminação da doença na vinha (Jermini e Gessler, 1996; Rinaldi, 2015).

Em resultado das infecções primárias, cerca de 3 a 4 dias após o aparecimento dos sintomas, formam-se os picnídios sobre as manchas nas folhas (Rego e Oliveira, 2007). As condições ótimas para que tal se verifique são a ocorrência de, pelo menos, 3 mm de precipitação (Ramsdell e Milholland, 1988) durante 1 a 3 horas (Spotts, 1980). A firme adesão à superfície do hospedeiro é também um aspeto importante para o sucesso da infecção. Se a duração da precipitação for superior a 3 horas, os esporos são lavados da superfície do hospedeiro o que diminui o risco de infecção (Rinaldi, 2015). Segundo Caltrider (1961), a temperatura ótima para a produção de conídios é de 25°C e para a germinação de esporos é de 30°C. Quando ocorre a adesão do conídio ao substrato, desencadeada pelo contato com superfícies hidrofóbicas (Shaw *et al.*, 2006), mais de 95% dos esporos germinam e em 6 horas desenvolve-se o apressório (Rinaldi, 2015). Quando existem níveis baixos de Ca^{2+} livre, a formação do apressório é reduzida o que dificulta as infecções (Shaw e Hoch, 2000).

Depois de ocorrer a infecção, o micélio do fungo limita-se às regiões subcuticulares das paredes anticlinais das folhas do hospedeiro (Kuo e Hoch, 1996). Segundo Ullrich *et al.* (2009), o fungo consegue infectar a face superior e a face inferior das folhas, penetrando pela cutícula e não pelos estomas.

O ciclo de vida de *Phyllosticta ampellicida*, encontra-se resumido na Figura 1.1.

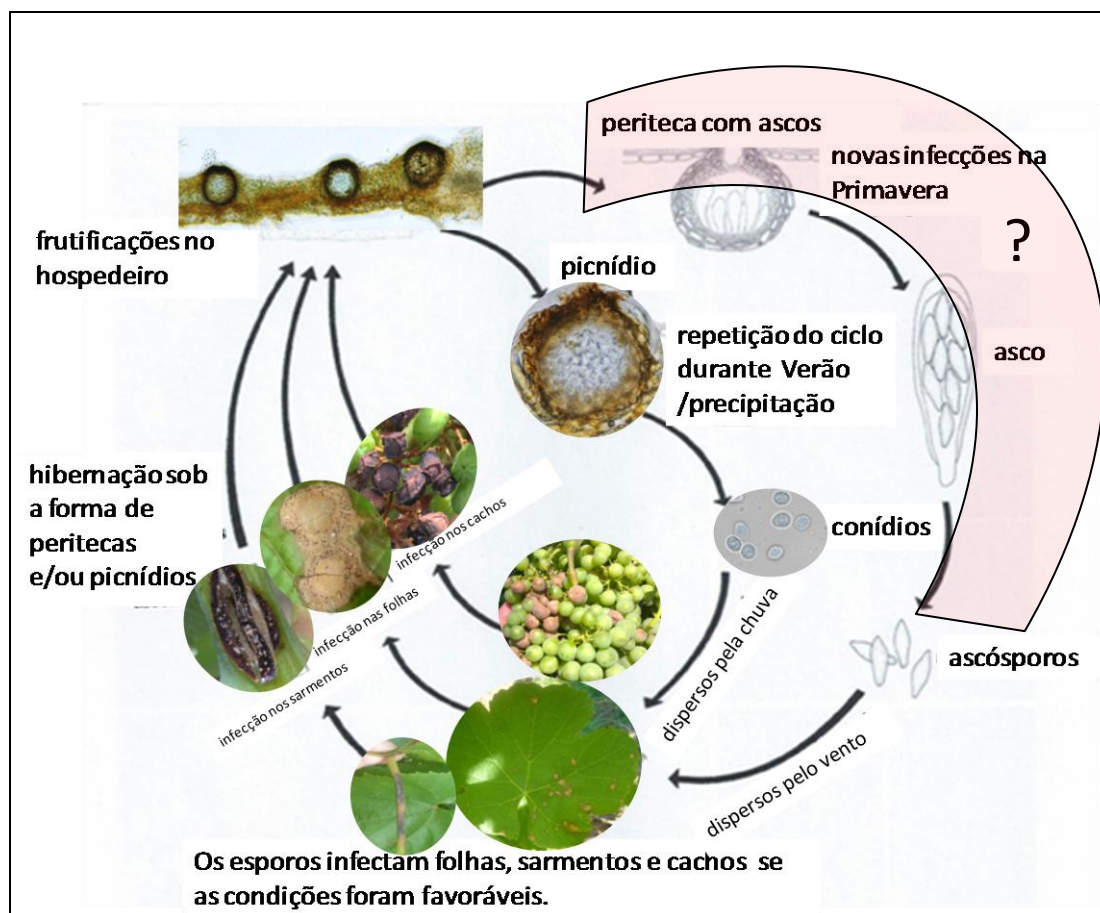


Figura 1.1 – Ciclo biológico de *Phyllosticta ampellicida*.
(Fonte: Rego *et al.*, 2012b)

A infecção das folhas depende da temperatura e da duração da humectação da folha (Spotts, 1977b). Quando a temperatura é de 26,5°C para ocorrer infecção nas folhas são necessárias apenas 6 horas enquanto, para uma temperatura de 10°C ou de 32°C são necessárias 24 horas ou 12 horas, respectivamente (Figura 1.2).

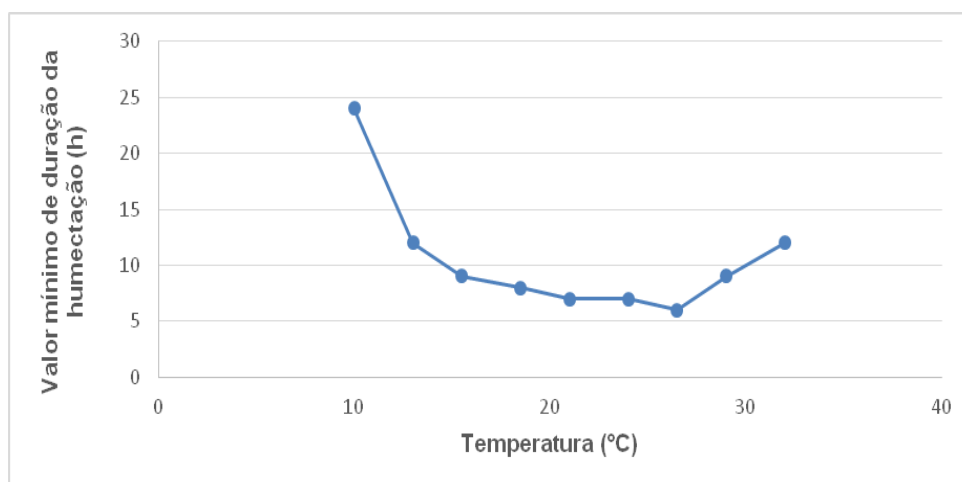


Figura 1.2 – Relação entre a temperatura e a duração da humectação das folhas necessária à infecção das folhas de videira por *Phyllosticta ampellicida*.
(adaptado Spotts, 1977b)

Os sintomas podem surgir em folhas jovens, não totalmente expandidas, enquanto folhas mais velhas, já totalmente expandidas, permanecem assintomáticas (Kuo e Hoch, 1996). O fungo permanece viável nestas folhas (Rinaldi, 2015) correspondendo este período à fase endófito (Luttrell, 1974).

Os bagos têm um maior período de suscetibilidade ao fungo entre uma a três semanas após a floração (Molitor e B-Loehnertz, 2011). No entanto, estudos efetuados demonstraram que até sete semanas após a floração podem ocorrer infecções (Hoffman *et al.*, 2002; Molitor e B-Loehnertz, 2011). Com o aumento do teor de açúcares nos bagos, a sensibilidade destes ao fungo é reduzida (Dubos, 1999). Porém, os sintomas podem ocorrer tardiamente nos cachos sendo derivados de infecções que ocorreram precocemente mas que tiveram um período de incubação maior devido à aproximação do final do período de suscetibilidade da videira (Hoffman *et al.*, 2002).

1.4. SINTOMATOLOGIA EM VIDEIRA

O fungo *P. ampellicida* tem a capacidade de infetar todos os órgãos verdes das videiras (Ramsdell e Milholland, 1988; Kuo e Hoch, 1996).

Nos pânpanos, pecíolos e ráquis, inicialmente, aparecem pontos esbranquiçados que, se as condições meteorológicas forem favoráveis, desenvolvem necroses acastanhadas e alongadas (Ramsdell e Milholland, 1988) (Figura 1.3 e Figura 1.4), sobre as quais, *a posteriori*, vão-se desenvolver os picnídios do patógeno (Rego *et al.*, 2012; Rinaldi, 2015).

No limbo da folha, na página superior, aparecem pequenas manchas circulares castanho-claro a púrpura (Rego *et al.*, 2012) (Figura 1.5). Estas manchas podem atingir entre 2 a 10 mm de diâmetro (Molitor e Beyer, 2014) contudo, pode ocorrer sobreposição e originar manchas de maiores dimensões, com as condições climáticas favoráveis, passados poucos dias aparecem os picnídios distribuídos circularmente sobre as manchas (Figura 1.6) (Ramsdell e Milholland, 1988; Rego *et al.*, 2012; Rinaldi, 2015). As margens das manchas são tipicamente castanho-escuro (Molitor e Beyer, 2014).



Figura 1.3 – Lesões alongadas nos pecíolos de videira.

Figura 1.4 – Lesões acastanhadas nos lançamentos de videira.

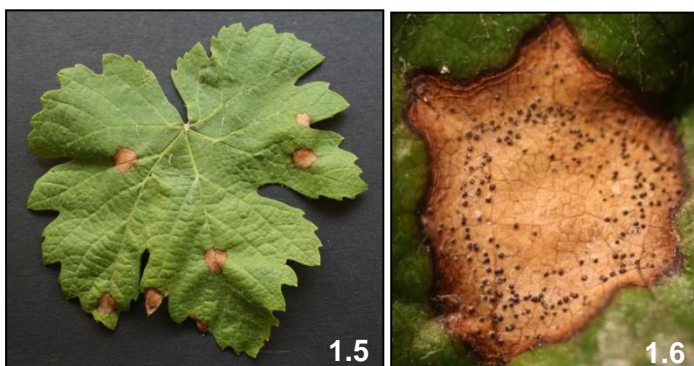


Figura 1.5 – Manchas castanhas em folhas de videira.

Figura 1.6 – Lesões de podridão negra com picnídios em folhas de videira.

O início da infeção nos bagos apresenta-se sob a forma de manchas em depressão de coloração castanho-rosada (Figura 1.7) (Rego *et al.*, 2012), posteriormente, com a evolução da doença, o bago começa a secar e a enrugar acabando por mumificar com coloração preta azulada (Ramsdell e Milholland, 1988) (Figura 1.8). Os picnídios vão-se desenvolver sobre estas manchas (Figura 1.9), fazendo com que a película do bago fique com um aspeto rugoso (Rego *et al.*, 2012). Se a infeção nos bagos ocorrer já perto do final do período de suscetibilidade, os bagos podem não secar totalmente. Os bagos infetados por esta doença, transmitem um sabor desagradável ao vinho (Molitor e Beyer, 2014).



Figura 1.7 – Bagos com manchas em depressão com uma coloração castanho-rosada.

Figura 1.8 – Bagos mumificados de videira.



Figura 1.9 – Bagos enrugados com picnídios.

Os sintomas, por vezes, podem ser confundidos com doenças causadas por outros fungos, tais como, *Elsinoe ampelina* (antracnose), *Phomopsis viticola* (escoriose), *Plasmopara viticola* (míldio) ou *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta) porém, o aparecimento dos picnídios sobre as manchas é característico da podridão negra (Sosnowski *et al.*, 2011; Molitor e Beyer, 2014) com exceção para regiões de clima mais quente, onde estas frutificações por vezes não se diferenciam (Rinaldi, 2013a).

1.5. MEIOS DE LUTA

A proteção das vinhas relativamente à podridão negra é garantida pela integração de meios de luta culturais e aplicações de fungicidas anti-míldio e anti-óidio não sendo necessárias aplicações adicionais específicas (Harms *et al.*, 2005; Molitor e B.-Loehnertz, 2011).

1.5.1. Luta cultural

O controlo da podridão negra deve começar pela luta cultural através da redução do inóculo potencial com a eliminação do material infetado na vinha (Harms *et al.*, 2005; Tomoiaga e Comsa, 2010). Para tal, é necessário eliminar as videiras das vinhas abandonadas (Dubos, 1999; Ries, 1999), pois, devido à ausência de tratamentos, servem de reservatório de inóculo (Ullrich *et al.*, 2009) ano após ano. As cepas abandonadas e infetadas devem ser queimadas (Dubos, 1999; Ries, 1999). Esta medida diminui o inóculo potencial e reduz a disseminação da doença para outras regiões da área vitícola, como sucedeu em algumas regiões da Alemanha em 2003 e 2004 (Harms *et al.*, 2005).

Quando se realiza a poda de inverno, as varas atacadas e os cachos mumificados devem ser retirados e deve-se proceder à sua queima (Dubos, 1999; Ries, 1999). A poda mecânica, assim como a colheita mecânica, devem ser evitadas pois, ao deixar as gavinhas e cachos infetados na videira aumenta o nível de inóculo (Mugnai, 2012). Estas práticas

mecânicas não são seletivas na vinha e, além disso, facilitam a dispersão da doença (Rinaldi, 2015).

A lenha de poda infetada não deve ser utilizada em outras vinhas como adubação orgânica a não ser que seja sujeita previamente a um processo de compostagem (Loskill *et al.*, 2009).

O arejamento da sebe permite reduzir a duração da humectação foliar (Dubos, 1999; Ries, 1999) e, conseqüentemente, reduzir a ocorrência de infeções (Molitor e Beyer, 2014). Logo, devem ser utilizados sistemas de condução que promovam um arejamento adequado (Northover, 2008).

O enrelvamento reduz a deslocação dos esporos do fungo do solo (varas de poda infetadas) para a vegetação da videira (Mugnai, 2012).

A adubação azotada deve ser baixa a moderada (Tomoiaga e Comsa, 2010) de modo a evitar o vigor excessivo da planta (Molitor e Beyer, 2014).

Albrecht e Kortekamp (2009) revelaram que *P. ampellicida* era sensível ao glufosinato de amónio, substância ativa presente nos herbicidas BASTA® e TROLLEY®. Conseqüentemente, estes produtos podem ser utilizados no tratamento da madeira de poda deixada no solo reduzindo assim o inóculo potencial na vinha.

Sosnowski *et al.* (2012) propõem um protocolo em que utiliza uma poda drástica para a erradicação do patógeno. Os patógenos “não-sistêmicos”, como é o caso de *P. ampellicida*, têm um bom potencial para serem erradicados por esta técnica, pois só se encontram presentes nos frutos, folhas e lançamentos jovens infetados. O protocolo proposto com base na poda drástica consiste na remoção das partes das videiras potencialmente infetadas, conseguindo desta forma recuperar mais rapidamente e com menores custos (sem proceder ao arranque) a vinha e a sua produção em quantidade e qualidade. Contudo, para se obterem melhores resultados, a poda drástica deve ser conjugada com a remoção da lenha da poda e o “mulching” do solo da vinha, durante a recuperação das videiras. Devem, igualmente, ser retirados os ramos ladrões e realizadas aplicações de fungicidas, tais como, a mistura de miclobutanil com mancozebe (BAKTHANE®), que demonstrou bons resultados no controlo da doença. O “mulching” e as aplicações de fungicidas devem ser continuados durante, no mínimo, dois anos a seguir à poda drástica (Sosnowski *et al.*, 2012).

1.5.2. Luta química

Atualmente, muitos dos fungicidas que estão homologados para doenças como a escoriose,

o míldio e o oídio demonstraram serem eficazes no combate à podridão negra (Dubos, 1999; EPPO/OEPP, 2002; Hoffman e Wilcox, 2002), o que, para além de combater a doença, também permite reduzir os níveis de inóculo de *P. ampelícola* nas vinhas.

A época crítica de proteção para a podridão negra decorre desde a fase em que os sarmentos atingem 10 cm de comprimento até à fase em que os bagos têm o tamanho de ervilha (Ramsdell e Milholand, 1988).

Fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe, manebe, metirame e propinebe), dos Q₀I (“quinone outside inhibitors”) (azoxistrobina, cresoxime-metilo, piraclostrobina e trifloxistrobina), e dos triazóis (fenneboconazol, miclobutanil, penconazol, tebuconazol e tetraconazol) mostraram um alto nível de eficácia no combate à doença (Ellis *et al.*, 1986; Wilcox e Riegel, 1997; Wilcox *et al.*, 1999; Hoffman e Wilcox, 2003; Harms *et al.*, 2005; Prates, 2012; Molitor e Beyer, 2014). Pelo contrário, a utilização de produtos cujas composições incluíam somente enxofre, meptildinocape, cobre ou folpete não se mostraram eficazes no combate à doença (Prates, 2012).

Estudos efetuados demonstraram que a eficácia dos triazóis e Q₀I é ligeiramente superior à dos ditiocarbamatos, sendo que com os primeiros se obtiveram eficácias de 91 a 100%, enquanto com os ditiocarbamatos se obtiveram 77 a 100% (Molitor e Beyer, 2014). Os ditiocarbamatos, possuem uma longa persistência biológica contra a podridão negra e os melhores resultados são obtidos quando aplicados preventivamente (Spotts, 1977a; Tomoiaga e Comsa, 2010; Molitor *et al.*, 2011).

O grupo dos triazóis, possui melhores resultados quanto à eficácia quando aplicados curativamente como foi demonstrado em diversos estudos (Spotts, 1977a, 1979; Ellis *et al.*, 1986; Hoffman e Wilcox, 2003; Molitor *et al.*, 2011), porém alguns têm melhores resultados quando aplicados preventivamente (Molitor *et al.*, 2011). Os triazóis devem ser combinados com os ditiocarbamatos, devido à sua excelente ação preventiva, para colmatar esta falha na eficácia de alguns triazóis (Molitor, 2009).

Hoffman e Wilcox (2003), Northover (2008) e Molitor (2009) nos seus estudos demonstraram que o fungo é muito suscetível aos Q₀I. Este grupo de fungicidas é especialmente recomendado no período mais suscetível da doença, entre a floração e o fecho dos cachos (Molitor e Beyer, 2014). Estudos realizados com algumas substâncias ativas deste grupo mostraram que a sua eficácia é diminuída quando aplicadas antes da queda da caliptra da flor sendo que a hipótese apontada é a da baixa translocação das estrobilurinas (Barlett *et al.*, 2002). Apesar de os Q₀I possuírem elevado risco de induzir resistência, Miessner *et al.*

(2011) demonstraram que esse risco é mínimo em *P. ampelícida*.

No mercado nacional estão disponíveis diversos fungicidas para o combate da podridão negra (Quadro 1.3).

Quadro 1.3 – Substâncias ativas autorizadas em Portugal para o combate da podridão negra.

(Fonte: Direção-Geral de Alimentação e Veterinária – DGAV)

Substância ativa	Formulação	Concentração (g sa /hl)	Intervalo de Segurança (dias)
<u>azoxistrobina</u>	SC	18,75-25	21
<u>azoxistrobina+folpete</u>	SC	14+75	42 (uvas para vinificação)
<u>bentiavalicarbe-isopropilo+mancozebe</u>	WG	2,88+126-3,2+140	28 (uvas de mesa) 56 (uvas para vinificação)
<u>cresoxime-metilo+penconazol</u>	WG	75+26,25-100+35	35
<u>folpete+piraclostrobina</u>	SE	80+8	42
<u>folpete</u>	WG	1500 gsa/ha	28
<u>mancozebe</u>	WP	160	28
	WG	157,5	28
<u>mancozebe+metalaxil-M</u>	WG	160+10	56 (uvas para vinificação)
<u>metirame+piraclostrobina</u>	WG	82,5+7,5	56
<u>tebuconazol+trifloxistrobina</u>	WG	6+3	35
<u>trifloxistrobina</u>	WG	6,25-7,5	

1.5.3. Luta biológica

Devido à impossibilidade de utilização de fungicidas sintéticos em viticultura biológica é de extrema importância a aplicação de outras medidas para evitar os danos causados pela podridão negra. Assim, o controlo deve passar por medidas de luta cultural e aplicação de compostos de cobre e enxofre preventivamente (Dufour, 2006; Loskill *et al.*, 2009).

Num estudo realizado por Travis *et al.* (2007), com cultivares de videiras norte-americanas mantidas em viticultura orgânica, o cobre mostrou ser o mais eficiente para a redução desta doença porém, a sua eficácia foi inferior quando comparado com os fungicidas orgânicos de síntese.

Em videiras de *V. vinífera*, compostos de octanoato de cobre ou hidróxido de cobre também demonstraram baixo nível de eficácia contra a podridão negra (Schildberger *et al.*, 2013).

Loskill *et al.* (2009) e Molitor *et al.* (2010) realizaram estudos para avaliar o efeito do enxofre no controlo da podridão negra e demonstraram que este fungicida tem potencial no seu controlo. Contudo, os melhores resultados foram atingidos com a combinação de cobre e enxofre em aplicações semanais (Loskill *et al.*, 2009).

Os fungicidas à base de enxofre devem ser utilizados de forma preventiva e por terem baixa persistência devem ser aplicados com intervalos de tempo curto (Molitor, 2012).

As saponinas estão presentes em alguns extratos de plantas e foram estudadas devido à sua atividade antimicrobiana (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007). Em alguns casos, a sua presença em plantas pode estar relacionada com a resistência a patógenos, o que indica a sua atividade fitoprotetora antimicrobiana (Schönbeck e Schlösser, 1976). Foram realizados ensaios com extratos de *Yucca* sp. (Travis *et al.*, 2007), *Sapindus mukorossi*, *Chenopodium quinoa*, *Quilaja* sp. (Molitor *et al.*, 2010), *Hedera helix* e raiz de *Prímula* (Koch *et al.*, 2013), que demonstraram ter uma boa atividade protetora contra a doença.

Nos estudos realizados, os extratos de *H. helix* (Elias *et al.*, 1991; Bedir *et al.*, 2000) e de raiz de *Prímula* (Müller *et al.*, 2006) inibiram altamente a germinação de conídios do patógeno e o crescimento micelial do patógeno, respetivamente, tendo-se obtido um elevado nível de proteção mesmo quando são utilizados em baixas concentrações (Koch *et al.*, 2013). Contudo, a utilização destes extratos em experiências de campo não mostraram resultados tão favoráveis quanto os obtidos em estufa. Estes resultados podem ser devidos à alta solubilidade das saponinas em água (Loskill *et al.*, 2009) o que reduz drasticamente a atividade protetora mesmo quando a quantidade de precipitação é baixa (Travis *et al.*, 2007).

Se forem desenvolvidas formulações que possam reduzir a sua solubilidade sem prejuízo da atividade antifúngica, as saponinas poderão vir a tornar-se um importante agente de controlo biológico da podridão negra (Koch *et al.*, 2013).

Em suma, em vinhas biológicas, especialmente em climas húmidos, o melhor controlo passa pela combinação de vários fatores, tais como, a seleção do local e os métodos culturais, a utilização, se possível, de castas com baixa suscetibilidade à doença e a utilização de cobre e enxofre (Molitor e Beyer, 2014).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *PHYLLOSTICTA AMPELICIDA*

2.1.1. Isolados

Neste trabalho foram estudados 30 isolados (Quadro 2.1) de *P. ampellicida* de origem nacional obtidos a partir de videiras com sintomas de podridão negra, em diferentes regiões e anos, cinco isolados de Itália, três isolados da Alemanha, dois isolados do Luxemburgo, três isolados da Hungria e um isolado do CBS, inicialmente identificado como *P. ampellicida* e, posteriormente, reclassificado como *P. parthenocissi* (Zhang *et al.*, 2013; Canaveira *et al.*, 2014).

Quadro 2.1 – Identificação da coleção de isolados de *Phyllosticta ampellicida* em estudo: designação adotada (referência original), ano, órgão da videira, casta, local de colheita (concelho) e País.

Designação adotada (referência original)	Ano	Órgão da videira	Casta	Local de Colheita (Concelho)	País
Gb1	2011	Folha - Limbo	Tinta Roriz	Tondela	Portugal
Gb2	2011	Folha - Limbo	Maria Gomes	Caldas da Rainha	Portugal
Gb3	2011	Folha - Limbo	Maria Gomes	Caldas da Rainha	Portugal
Gb4	2011	Folha - Limbo	Maria Gomes	Caldas da Rainha	Portugal
Gb5	2011	Folha - Limbo	Bastardo	Cantanhede	Portugal
Gb7	2011	Folha - Limbo	Sauvignon Blanc	Cantanhede	Portugal
Gb8	2011	Folha - Limbo	Sauvignon Blanc	Cantanhede	Portugal
Gb9	2011	Cacho - Bago	Chardonnay	Cantanhede	Portugal
Gb10	2011	Folha - Limbo	Jaen	Cantanhede	Portugal
Gb11	2011	Folha - Limbo	Jaen	Cantanhede	Portugal
Gb12	2011	Cacho - Bago	Baga	Cantanhede	Portugal
Gb13	2011	Cacho - Bago	Baga	Cantanhede	Portugal
Gb14	2011	Cacho - Bago	Fernão Pires	Cantanhede	Portugal
Gb15	2011	Cacho - Bago	Fernão Pires	Cantanhede	Portugal
Gb16	2011	Cacho - Bago	Água Santa	Cantanhede	Portugal
Gb17	2011	Cacho - Bago	Tinta Pinheira	Cantanhede	Portugal
Gb18	2011	Cacho - Bago	Tinta Pinheira	Cantanhede	Portugal
Gb19	2011	Folha - Limbo	-	Tondela	Portugal
Gb20	2011	Cacho - Bago	Água Santa	Cantanhede	Portugal
Gb21	2011	Folha - Limbo	Chardonnay	Viseu	Portugal
Gb22	2011	Cacho - Bago	-	Tondela	Portugal
Gb24	2011	Cacho - Bago	Baga	Cantanhede	Portugal
Gb25	2011	Folha - Limbo	Fernão Pires	Cantanhede	Portugal
Gb26	2012	Folha - Limbo	Arinto	Alcácer do Sal	Portugal
Gb27	2013	Folha - Limbo	Jaen	Mangualde	Portugal
Gb28	2013	Folha - Limbo	Merlot	Anadia	Portugal
Gb29	2013	Folha - Limbo	Chardonnay	Anadia	Portugal
Gb30	2013	Folha - Limbo		Ponte de Lima	Portugal
Gb31	2013	Folha - Limbo	Vinhão	Ponte de Lima	Portugal
Gb32	2013	Folha - Limbo		Ponte de Lima	Portugal
Gb33 (G1.2)					Itália
Gb34 (G1.13)					Itália

Quadro 2.1 – Identificação da coleção de isolados de *Phyllosticta ampellicida* em estudo: designação adotada (referência original), ano, órgão da videira, casta, local de colheita (concelho) e País (cont.).

Designação adotada (referência original)	Ano	Órgão da videira	Casta	Local de Colheita (Concelho)	País
Gb35 (G1.16)					Itália
Gb36 (G1.35)					Itália
Gb37 (G2.14)					Itália
Gb93 (Be 61)					Luxemburgo
Gb97 (Be 65)					Alemanha
Gb117 (Li 2)					Alemanha
Gb119 (Li 4)					Luxemburgo
Gb121 (Li 6)					Alemanha
Gb122 (F8 12/18)					Hungria
Gb123 (F12/8)					Hungria
Gb124 (F12/48)					Hungria
Gb125 (CBS 111645)				Missouri	EUA

2.1.2. Características culturais e morfológicas

Na caracterização cultural dos isolados usaram-se placas de Petri de poliestireno de 90 mm de diâmetro com gelose de batata glucosada (Potato Dextrose Agar - PDA, Difco, BD, Sparks, MD, USA.). O inóculo utilizado foi colocado em estufas de incubação a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias e utilizaram-se discos miceliais, com aproximadamente 3 mm de diâmetro, retirados da zona periférica de cada uma das colónias dos isolados em estudo, com o auxílio de um anel cortante. As placas de Petri inoculadas foram colocadas em estufa de incubação a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, na obscuridade, durante 10 dias (Rego *et al.*, 2012). Ao fim do período de incubação, foram observadas as seguintes características culturais em cada cultura (verso e reverso): aspeto cultural, densidade da colónia, coloração, frente de crescimento, aspeto à transparência e zonagem. A cor das colónias foi determinada por comparação com a carta de cores de Rayner (1970).

Para as características morfológicas foram utilizadas culturas que cresceram em placas de Petri com PDA a 50%. As placas foram inoculadas como acima descrito e foram colocadas em estufas de incubação a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ com 12 horas de luz-dia, emitida por lâmpadas tubulares Philips TL 15W/33, durante um período de 10 dias (Kuo e Hoch, 1995). Decorrido este período de tempo, fizeram-se preparações semipermanentes entre lâmina e lamela com as frutificações formadas, montadas numa mistura de lactofenol e azul de algodão a 0,5% e, de seguida, foram observadas ao microscópio (Leica DM 2500) com ampliação de 1000x. Para avaliação das características biométricas dos conídios (medição de 20 conídios por isolado), determinaram-se os valores extremos destes (comprimento e largura), as médias e desvios padrões.

2.1.3. Influência da temperatura no crescimento micelial

Foram realizados ensaios de temperatura para se determinar qual a temperatura mínima, máxima e ótima de crescimento de *P. ampelícida*.

Como inóculo foram utilizados cilindros de gelose com o fungo, com aproximadamente 2 mm de diâmetro, que foram retirados da zona periférica de cada um dos isolados em estudo, com o auxílio de um anel cortante. Foram colocados em placas de Petri com PDA, em estufas de incubação, na obscuridade, durante 10 dias nas diferentes temperaturas estudadas: 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. Para cada temperatura foram realizadas cinco repetições para cada isolado.

Findo o período de incubação, efetuou-se a medição do diâmetro da colônia segundo duas direções ortogonais e calculou-se a média aritmética dos valores obtidos para cada repetição.

2.1.4. Caracterização molecular dos isolados

2.1.4.1. Condições de cultura dos isolados, extração e quantificação de DNA

Para a extração do DNA, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo PDA e mantidos em estufa a uma temperatura de 25±1°C, na obscuridade, durante 7 dias, para promover o crescimento micelial.

A extração do DNA foi realizada tendo por base o protocolo de extração descrito por Ceniz (1992). O micélio de cada isolado foi obtido por raspagem da cultura e colocado em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. O micélio foi lavado com 500 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), centrifugado durante 5 minutos a 13000 rpm e à temperatura de 4°C (Centrífuga Hettich 32R), e, após a centrifugação, o sobrenadante foi decantado. Adicionou-se 500 µl de tampão de extração de Ceniz (200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 250 mM EDTA; 0,5% SDS, p/v) e o micélio foi esmagado com um “conical grinder”. Posteriormente, foi adicionado 150 µl de acetato de sódio (3 M, pH 5,2), misturou-se por inversão e os tubos foram colocados a -20°C durante 20 minutos. Após este tempo, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos (13000 rpm, 4°C) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Este passo foi repetido até não haver fase sólida. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de isopropanol frio e, após 5 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram agitados lentamente por inversão até à formação de um novelo. Procedeu-se à centrifugação dos tubos nas mesmas condições acima mencionadas e o sobrenadante foi

eliminado. O “pellet” foi lavado com 1 ml de etanol a 70% frio, centrifugado durante 5 minutos (13000 rpm, 4°C) e, no final, foi eliminado o sobrenadante. O “pellet” secou à temperatura ambiente, posteriormente, adicionaram-se 50 µl de TE e colocaram-se os tubos a 4°C até à utilização de DNA.

A quantificação do DNA foi efetuada por electroforese em gel de agarose a 1%, preparado com TBE 0,5X (45 mM Tris-base, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA, pH 8,0; Sambrook *et al.*, 1989), por comparação com uma gama de quantidades conhecidas (50, 100, 250 e 500 ng) de DNA do fago λ (Amersham, GE Healthcare, Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) colocados nos poços centrais. Nos restantes poços foram colocados 2 µL de DNA misturados com 10 µL de azul de bromofenol. A electroforese decorreu numa tina horizontal (Horizon 20-25, Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, Life Technologies/GibcoBRL), durante 1 hora a 80 V, sendo a corrente gerada pela fonte “Electrophoresis Power Supply – EPS 100, Pharmacia Biotech” e tendo-se utilizado TBE 0,5X como tampão de electroforese.

No fim da eletroforese, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 10 minutos e, posteriormente, lavado com água destilada durante 20 minutos.

Os resultados da quantificação foram observados em transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) “BTX 20.M, UVItec Limited” e registados utilizando uma impressora térmica “Mitsubishi Model P91E”. Efetuaram-se soluções de trabalho para cada isolado à concentração de 10 ng/µL com água MilliQ esterilizada.

2.1.4.2. Análise da variabilidade dos isolados por ISSR-PCR

Na análise da variabilidade dos isolados de *P. ampellicida* recorreu-se a marcadores aleatórios ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). Foram utilizados quatro iniciadores, (GA)₈YT, (AG)₈YT, HVH(TG)₇ e (CAG)₅ (Fang e Roose, 1997; Gilbert *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001).

Cada reação de amplificação foi realizada em 15 µL constituídos por 1X de tampão de PCR, 200 µM de cada dNTP (GE Healthcare, Life Sciences), 0,5 µM do iniciador (sintetizado pela Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,6 U de DreamTaq DNA polimerase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific) e 25 ng de DNA genómico. No controlo negativo utilizou-se água MilliQ esterilizada em substituição do DNA.

O programa de amplificação utilizado com os iniciadores (GA)₈YT, (AG)₈YT e HVH(TG)₇ está representado no Quadro 2.2 (Talhinhas *et al.*, 2003) e o do iniciador (CAG)₅ está representado no Quadro 2.3 (Alves *et al.*, 2007). As reações de PCR decorreram num termociclador Biometra-T-Gradient.

Quadro 2.2 – Programa de amplificação utilizado para os iniciadores (GA)₈YT, (AG)₈YT e HVH(TG)₇

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré-desnaturação	94°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	40
Hibridação	52°C	45 segundos	
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

Quadro 2.3 – Programa de amplificação utilizado para o iniciador (CAG)₅

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré-desnaturação	95°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	1 minuto	30
Hibridação	50°C	1 minuto	
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

Após a amplificação, os produtos obtidos foram separados por electroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5X numa tina horizontal (Horizon 20-25, Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, Life Technologies/GibcoBRL). Em cada um dos poços extremos do gel foram colocados 6 µL do marcador de peso molecular “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder” (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific). A electroforese decorreu à temperatura ambiente, durante 18 horas a 40 V.

Os fragmentos amplificados foram visualizados tal como referido em 2.1.4.1., as imagens foram captadas utilizando o programa Image Link 2.5 (Image Capture and Transfer Software, Unitec, Cambridge, UK) e guardadas em ficheiro TIFF.

Na análise dos resultados foi utilizado o programa GelCompar II versão 5.10 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium). Os géis foram normalizados, para cada iniciador, utilizando os marcadores de peso molecular como padrão. A deteção e o emparelhamento das bandas

foram realizados pelo programa e verificadas manualmente, gerando uma matriz binária de presença/ausência de bandas.

Para o cálculo da matriz de similaridade, foi aplicado à matriz binária o coeficiente de similaridade de “Dice” (para cada par de isolados, $S_D = 2a/(2a + b)$, em que a = número de bandas compartilhadas e b = número de bandas não compartilhadas; Dice, 1945; Nei & Li, 1979). À matriz de similaridade obtida, foi efetuada uma análise aglomerativa através do método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages” ou método de agrupamento em pares não-balanceados usando médias aritméticas), através do qual se obteve o dendrograma.

A análise foi realizada para cada iniciador separadamente, assim como para o conjunto dos quatro iniciadores.

A robustez dos grupos formados foi avaliada por análise de “bootstraps”, tendo-se reconstruído os dendrogramas 2000 vezes.

2.2. DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *PHYLLOSTICTA AMPELICIDA* EM VIDEIRA

2.2.1. Obtenção de material vegetal

Para o estudo de patogenicidade foram utilizados enxertos-prontos da casta Fernão Pires sobre 1103P. As plantas, recebidas de um viveiro comercial, foram envasadas em sacos de polietileno negro com cerca de 1 L de capacidade, contendo uma mistura composta por terra vegetal, turfa e areia (2:1:1, v/v), e dispostas segundo um delineamento de casualização global. Durante o período de ensaio, as plantas foram regularmente regadas e foram efetuados os tratamentos fitossanitários necessários, em que se utilizou enxofre e calda bordalesa para o combate de míldio e de oídio.

2.2.2. Produção de inóculo, inoculação e condições de inoculação e parâmetro avaliado

Neste estudo utilizaram-se sete videiras para cada um dos 44 isolados e para a testemunha. Utilizou-se uma adaptação do método descrito por Mostert *et al.* (2000).

Para a produção do inóculo, os isolados cresceram em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo PDA, durante 8 dias a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, na obscuridade.

Nos pâmpanos das videiras foram realizadas pequenas feridas, sobre as quais foram colocados discos miceliais de 3 mm dos isolados em estudo, retirados da periferia das colônias. Estes foram envolvidos com algodão humedecido em água destilada esterilizada e tapados com “Parafilm” durante 20 dias. Para a testemunha foi utilizado um disco de PDA (Figura 2.1).



Figura 2.1 – Método de inoculação utilizado: ferida nos pâmpanos (a, b); inoculação com o disco micelial de *Phyllosticta ampellicida* (c); colocação de algodão e “Parafilm” em redor do local de inoculação (d, e).

O ensaio decorreu em estufa de campo, a temperaturas de $24\pm 5^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$ (dia/noite) e com, aproximadamente, 12 horas de luz solar (Figura 2.2).

Três meses após a inoculação, as plantas foram desenvasadas e lavadas com água corrente para eliminar as partículas de substrato aderentes ao sistema radicular. De seguida, registou-se o comprimento e a largura das necroses, que se desenvolveram sobre os sarmentos inoculados, e, posteriormente, calcularam-se as respectivas áreas recorrendo à fórmula da elipse.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o tratamento das médias foi comparado utilizando o teste de Duncan com nível de significância de 5% no programa STATISTICA 8.0.



Figura 2.2 – Aspeto geral do ensaio de patogenicidade: videiras da casta Fernão Pires, mantidas durante três meses em estufa de campo, sob condições de temperatura diurna de $24\pm5^{\circ}\text{C}$ e temperatura noturna de 18°C , e aproximadamente 12 horas de luz solar.

2.2.3. Reisolamentos

Uma vez realizadas as determinações descritas em 2.2.2., retiraram-se seis fragmentos de madeira necrosada (por planta), que foram desinfetados em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 7% durante dois minutos e passados por água destilada esterilizada. Os fragmentos de madeira foram secos em papel de filtro e transferidos para placas de Petri contendo 20 ml de PDA, ao qual se havia adicionado, após autoclavagem e arrefecimento a 45°C , 250 mgL^{-1} de cloranfenicol (BioChemica, AppliChem, Darmstasdt, Germany). As placas foram a incubar à temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$, na obscuridade e, após um período de 12 dias, procedeu-se à repicagem das colónias dos fungos isolados para placas de Petri contendo PDA para posterior identificação. Procedeu-se de forma idêntica para as plantas testemunha.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA

No Quadro 3.1 estão descritas as características culturais de 34 isolados de *P. ampellicida* e do isolado de *P. parthenocissi* em estudo, observadas em meio de cultura de PDA, algumas das características podem ser observadas na Figura 3.1. Não foi possível fazer a caracterização dos restantes isolados, pois estes degeneraram no decorrer do trabalho experimental desta tese.

Em relação à face superior das colônias, verifica-se que o aspeto cultural varia entre o feltroso (Gb1, Gb2, Gb4, Gb7, Gb11, Gb12, Gb15, Gb16, Gb17, Gb18, Gb19, Gb20, Gb21, Gb22, Gb24, Gb28, Gb29, Gb35, Gb37 e Gb119), o feltroso a cotonoso (Gb3, Gb5, Gb8, Gb9, Gb10, Gb13, Gb14, Gb25, Gb26, Gb27, Gb36, Gb117, Gb121 e Gb124) e o cotonoso (Gb125). A densidade das colônias foi média a forte para todos os isolados.

A coloração do micélio variou entre cinzenta (Gb121), bege a cinzenta esverdeada (Gb3, Gb10, Gb25 e Gb124), cinzenta a esverdeada (Gb1, Gb2, Gb4, Gb5, Gb7, Gb8, Gb9, Gb11, Gb12, Gb13, Gb14, Gb15, Gb16, Gb17, Gb18, Gb19, Gb20, Gb21, Gb22, Gb24, Gb26, Gb27 Gb28, Gb29, Gb35, Gb36, Gb37, Gb117 e Gb119) e negra (Gb125).

A frente de crescimento apresentou-se regular para os isolados (Gb1, Gb2, Gb4, Gb7, Gb11, Gb12, Gb15, Gb17, Gb19, Gb20, Gb21, Gb22, Gb24, Gb28, Gb29, Gb35, Gb37 e Gb119) e irregular para todos os restantes. O aspeto à transparência foi homogêneo em todos os isolados.

A zonagem foi ausente para a maioria dos isolados. A exceção, foram os isolados Gb121 e Gb125 que apresentaram uma zonagem concêntrica fraca.

Em relação à face inferior das culturas, todos os isolados apresentaram características idênticas às da face superior com exceção da cor.

A análise das características culturais observadas, para o conjunto dos isolados em estudo, revelou a existência de diferenças entre os isolados, principalmente no que se refere ao aspeto cultural, densidade, coloração do micélio e zonagem. Contudo, essas diferenças distribuem-se por diferentes grupos de isolados e, além disso, encontram-se dentro dos limites definidos para a espécie *P. ampellicida* (Reddick, 1911; Kuo e Hoch, 1995; Rego e Oliveira, 2007). O isolado Gb125, espécie *P. parthenocissi*, distinguiu-se dos restantes pelo aspeto cultural, coloração negra e presença de zonagem concêntrica.

Quadro 3.1 – Características culturais de isolados de *Phyllosticta* spp. em PDA, ao fim de 10 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25±1°C.

Isolado	Aspeto cultural	Densidade da colônia	Coloração	Frente de crescimento	Aspeto à transparência	Zonagem	Face inferior
Gb1, Gb2, Gb4, Gb7, Gb11, Gb12, Gb15, Gb17, Gb19, Gb20, Gb21, Gb22, Gb24, Gb28, Gb29, Gb35, Gb37, Gb119	feltroso	média a forte	cinzenta a esverdeada	regular	homogêneo	ausente	idem para face superior exceto na coloração (negra a verde escura)
Gb3, Gb10, Gb25, Gb124	feltroso a cotonoso	média a forte	bege a cinzenta esverdeada	irregular	homogêneo	ausente	idem para face superior exceto na coloração (negra a verde escura)
Gb5, Gb8, Gb9, Gb13, Gb14, Gb26, Gb27, Gb36, Gb117	feltroso a cotonoso	média a forte	cinzenta a esverdeada	irregular	homogêneo	ausente	idem para face superior exceto na coloração (negra a verde escura)
Gb16, Gb18	feltroso	média a forte	cinzenta a esverdeada	irregular	homogêneo	ausente	idem para face superior exceto na coloração (negra a verde escura)
Gb121	feltroso a cotonoso	média a forte	cinzenta	irregular	homogêneo	concêntrica fraca	idem para face superior exceto na coloração (negra a verde escura)
Gb125	cotonoso	média a forte	negra	irregular	homogêneo	concêntrica fraca	idem para face superior

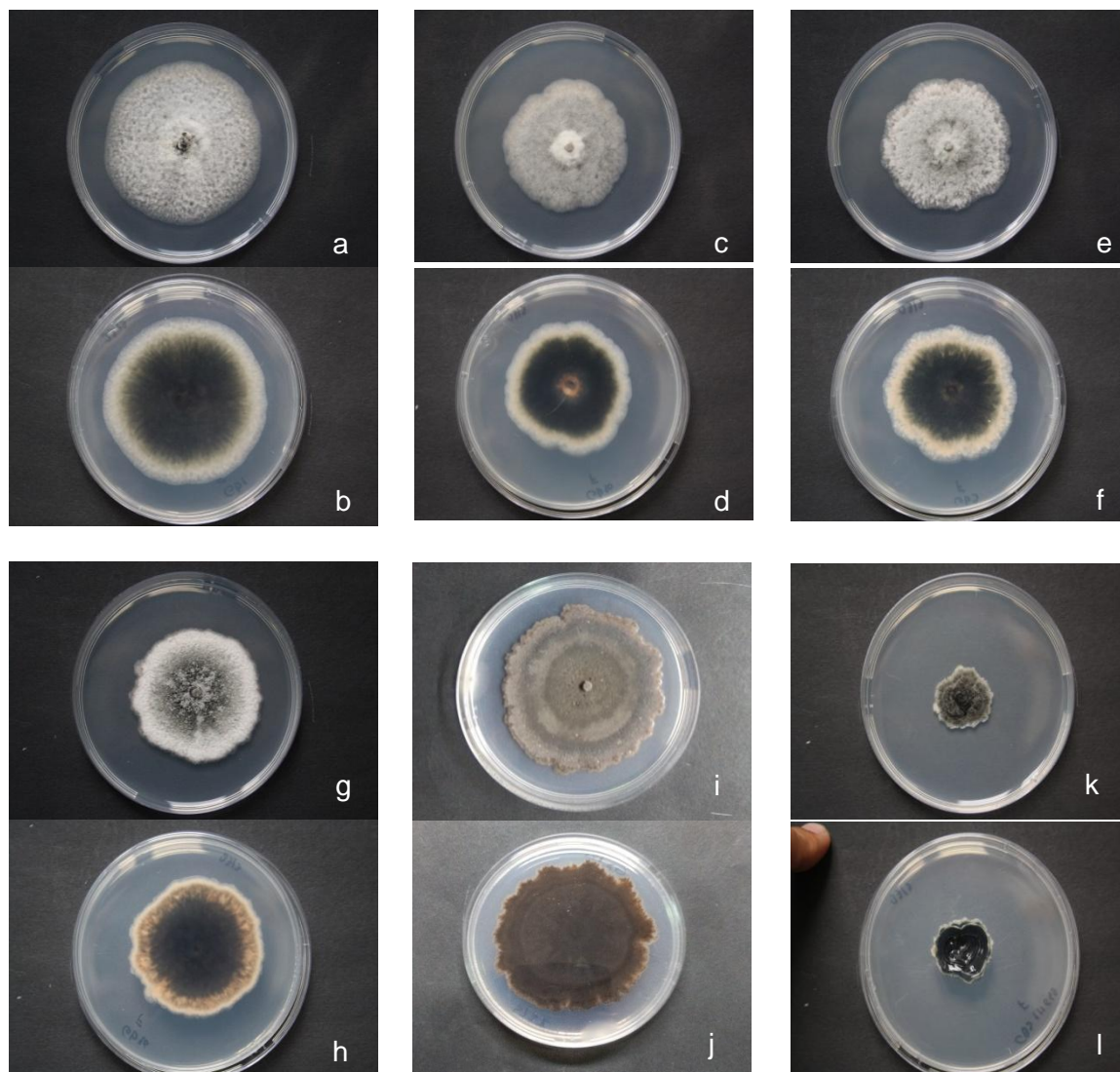


Figura 3.1 – Culturas de *Phyllosticta ampellicida*, em meio PDA, ao fim de 10 dias sob condições de obscuridade e temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Em cima: face superior. Em baixo: face inferior. a e b, Gb1; c e d, Gb10; e e f, Gb9; g e h, Gb16; i e j, Gb121; k e l, Gb125.

As características biométricas dos conídios de *P. ampellicida* são apresentadas no Quadro 3.2. Relativamente aos isolados portugueses, o Gb25 foi o que apresentou uma média maior na dimensão dos esporos tanto em comprimento ($10,16\ \mu\text{m}$) como em largura ($6,59\ \mu\text{m}$). O isolado com menor média de comprimento foi o Gb27 ($7,96\ \mu\text{m}$) enquanto o isolado com menor média de largura dos esporos foi o Gb10 ($5,26\ \mu\text{m}$). Em relação aos restantes isolados, o que obteve maior média no comprimento dos esporos foi o isolado Gb37 ($8,07\ \mu\text{m}$) e o isolado Gb123 obteve uma maior média na largura dos esporos ($5,58\ \mu\text{m}$). O isolado Gb36 foi o que obteve menores médias de comprimento ($7,53\ \mu\text{m}$) e de largura ($4,80\ \mu\text{m}$) dos esporos. Não foi possível apurar as características biométricas de todos os isolados, pois até ao final deste trabalho, 15 isolados não esporularam.

Quadro 3.2 – Características biométricas dos conídios de 43 isolados de *Phyllosticta ampellicida* (Gb) e um de *Phyllosticta parthenocissi* em meio de PDA, após dez dias de incubação, à temperatura de 25±1°C e na obscuridade.

Isolado	Dimensões dos conídios (µm)*	
	Comprimento	Largura
Gb1	(7,64-) 9,15 (-11,39) ± 1,08	(5,15-) 5,83 (-6,52) ± 0,34
Gb2 **	(7,37-) 8,60 (-9,44) ± 0,71	(5,74-) 6,48 (-7,15) ± 0,43
Gb3 **	(6,71-) 9,27 (-10,94) ± 1,28	(4,71-) 6,09 (-7,18) ± 0,68
Gb4	(8,07-) 9,46 (-11,24) ± 1,07	(5,73-) 6,46 (-7,23) ± 0,40
Gb5	(6,37-) 8,35 (-11,03) ± 1,11	(4,50-) 6,22 (-7,14) ± 0,60
Gb7	(6,85-) 8,48 (-10,26) ± 1,07	(5,25-) 6,46 (-8,05) ± 0,60
Gb8 **	(6,49-) 8,44 (-10,35) ± 0,99	(6,04-) 6,52 (-7,28) ± 0,37
Gb9	(7,94-) 9,53 (-11,11) ± 0,87	(5,47-) 6,15 (-6,96) ± 0,36
Gb10	(6,11-) 8,73 (-12,10) ± 1,41	(3,76-) 5,26 (-6,21) ± 0,56
Gb11	(6,83-) 8,94 (-11,62) ± 1,34	(5,15-) 6,05 (-7,06) ± 0,55
Gb12	(8,43-) 9,92 (-12,30) ± 0,91	(5,42-) 6,30 (-8,27) ± 0,62
Gb13	(7,91-) 9,06 (-11,48) ± 0,92	(4,99-) 6,20 (-6,89) ± 0,47
Gb14	-	-
Gb15	(7,05-) 8,53 (-10,34) ± 0,92	(5,80-) 6,62 (-7,29) ± 0,37
Gb16	-	-
Gb17	(7,05-) 8,63 (-10,87) ± 0,88	(5,10-) 6,55 (-10,17) ± 0,56
Gb18 **	(7,94-) 8,90 (-10,17) ± 0,72	(5,80-) 6,37 (-7,11) ± 0,54
Gb19	(6,31-) 8,07 (-9,90) ± 0,92	(5,41-) 6,19 (-6,95) ± 0,37
Gb20	(7,61-) 8,98 (-11,60) ± 1,01	(4,51-) 6,01 (-6,72) ± 0,47
Gb21	(6,21-) 8,05 (-9,65) ± 0,97	(5,62-) 6,34 (-7,16) ± 0,43
Gb22 **	(7,81-) 9,78 (-11,17) ± 1,11	(5,15-) 6,24 (-7,74) ± 1,02
Gb24	(7,41-) 9,12 (-11,39) ± 1,08	(5,51-) 6,40 (-7,67) ± 0,55
Gb25	(7,48-) 10,16 (-14,62) ± 1,59	(5,63-) 6,59 (-7,57) ± 0,55
Gb26	(7,37-) 8,61 (-9,79) ± 0,69	(4,53-) 5,51 (-6,49) ± 0,46
Gb27	(6,68-) 7,96 (-9,72) ± 0,81	(3,33-) 5,63 (-6,63) ± 0,66
Gb28	-	-
Gb29	-	-
Gb30	-	-
Gb31	-	-
Gb32	(7,51-) 8,83 (-10,82) ± 0,87	(4,94-) 5,97 (-6,58) ± 0,43
Gb33	-	-
Gb34	-	-
Gb35	-	-
Gb36 **	(6,01-) 7,53 (-9,45) ± 0,81	(4,02-) 4,80 (-6,55) ± 0,69
Gb37	(6,83-) 8,07 (-9,02) ± 0,54	(3,99-) 5,35 (-6,53) ± 0,58
Gb93	-	-
Gb97	-	-
Gb117	-	-
Gb119	-	-
Gb121	-	-
Gb122	-	-
Gb123	(6,24-) 7,95 (-9,92) ± 0,81	(4,80-) 5,58 (-6,05) ± 0,32
Gb124	(8,36-) 9,25 (-10,82) ± 0,71	(5,39-) 6,59 (-7,72) ± 0,55
Gb125	(8,25-) 9,09 (-10,39) ± 0,57	(5,55-) 6,54 (-7,41) ± 0,46

* os valores entre parêntesis correspondem aos valores mínimos e máximos, enquanto que o valor intermédio corresponde à média, ± o desvio padrão; ** não foi possível fazer a medição de 20 esporos; - isolados que não esporularam.

As características biométricas dos conídios para a maioria dos isolados em estudo estão em concordância com as referidas pelos diferentes autores para a espécie *P. ampelicida* (Reddick, 1911; Kuo e Hoch, 1995; Rego e Oliveira, 2007; Kong, 2012). As dimensões dos conídios do isolado Gb125, espécie *P. parthenocissi*, não se distinguiram das da maioria dos isolados de *P. ampelicida*. Na Figura 3.2 apresentam-se conídios de *Phyllosticta ampelicida*.

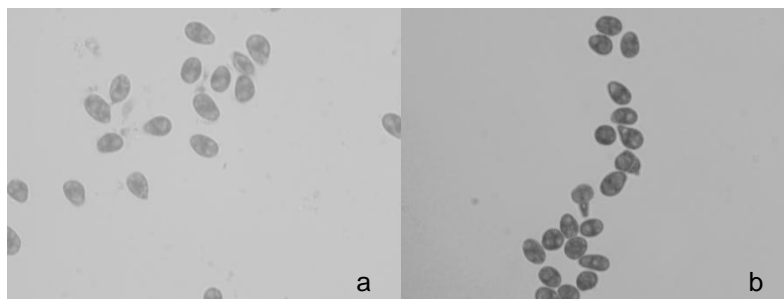


Figura 3.2 – Conídios de *Phyllosticta ampelicida* em PDA, ao fim de dez dias, com fotoperíodo de 12 horas e à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. a, Gb1; b, Gb123.

3.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICELIAL

Nas Figura 3.3 a Figura 3.8 podem ser observados os gráficos do crescimento micelial de *Phyllosticta* (43 isolados de *Phyllosticta ampelicida* e um de *Phyllosticta parthenocissi*) para diversas temperaturas em meio de PDA e após 10 dias de crescimento na obscuridade.

Para a temperatura de 10°C somente os isolados Gb17 (2 mm), Gb20 (2 mm) e Gb28 (1 mm) mostraram algum crescimento, esta temperatura não aparenta ser favorável para o crescimento micelial do fungo (Figura 3.3).

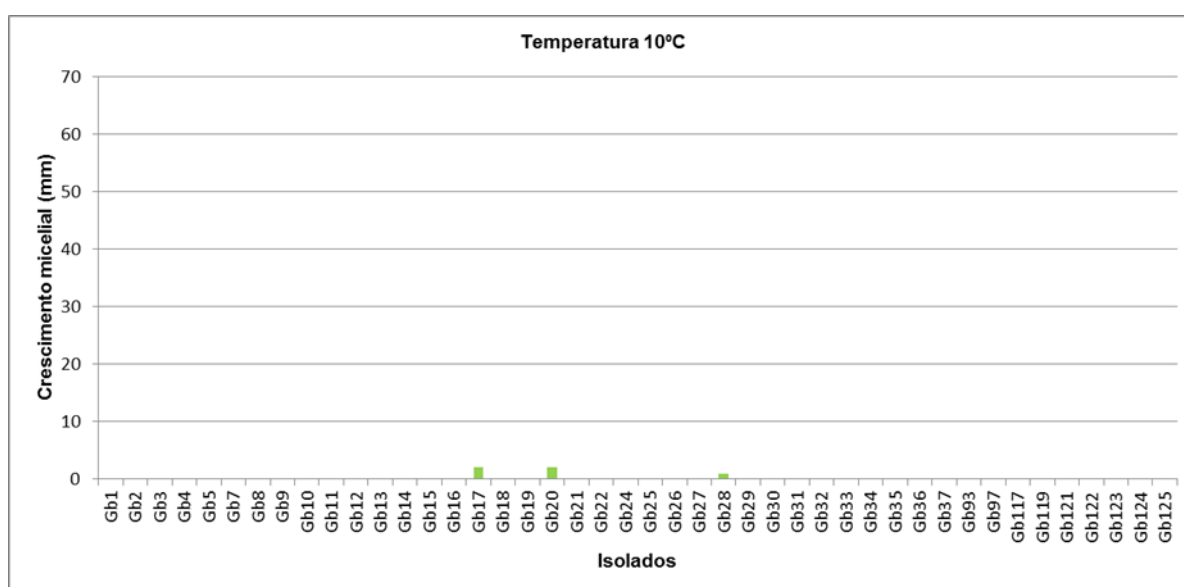


Figura 3.3 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de *Phyllosticta* spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 10°C .

Para a temperatura de 15°C (Figura 3.4) já se verificou crescimento micelial para a maioria dos isolados exceto para os isolados Gb33, Gb34, Gb122, Gb123 e Gb124. Para esta temperatura o isolado que obteve maior crescimento foi o Gb4 (22 mm).

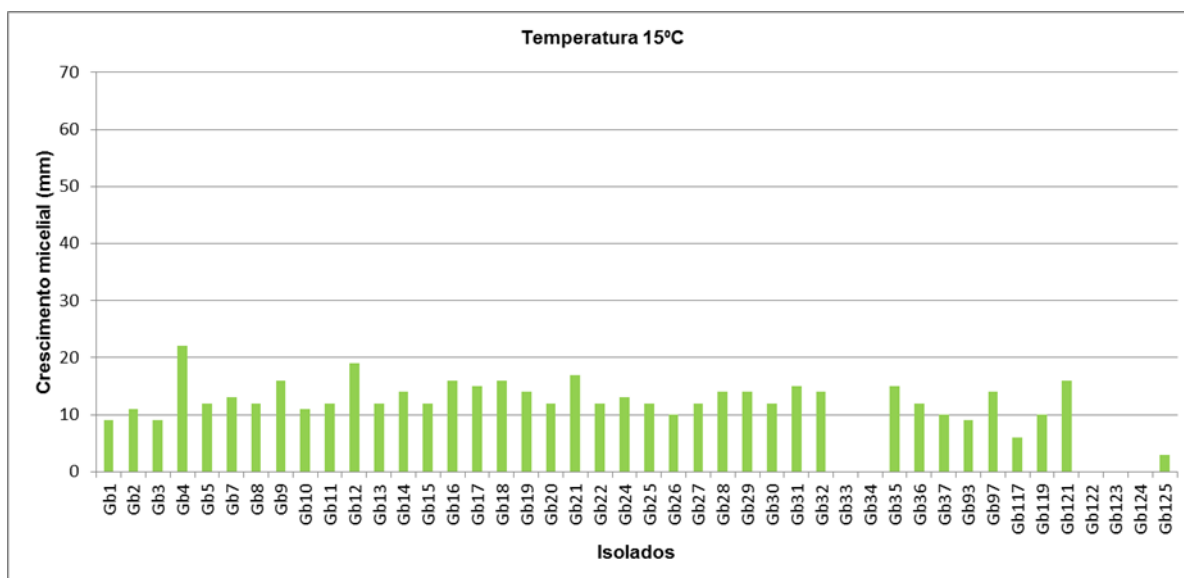


Figura 3.4 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de *Phyllosticta* spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 15°C.

A 20°C verificou-se o crescimento de todos os isolados em estudo. O isolado Gb16 foi onde se verificou maior crescimento (49 mm) e no isolado Gb124 foi onde se verificou um menor crescimento (10 mm) (Figura 3.5).

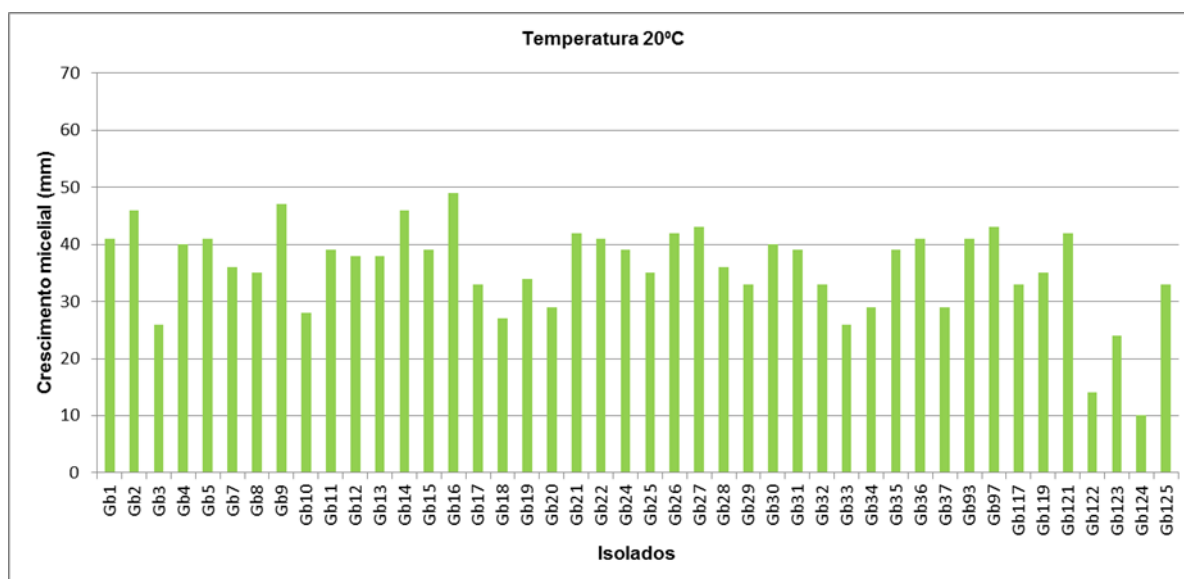


Figura 3.5 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de *Phyllosticta* spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 20°C.

À temperatura de 25°C foi onde se verificou um maior crescimento do fungo, o que indica que, para a maioria dos isolados, esta é a temperatura ótima para o seu crescimento. O isolado onde se verificou maior crescimento foi no Gb93 (66 mm) e o menor crescimento verificou-se para o isolado Gb124 (10 mm) (Figura 3.6).

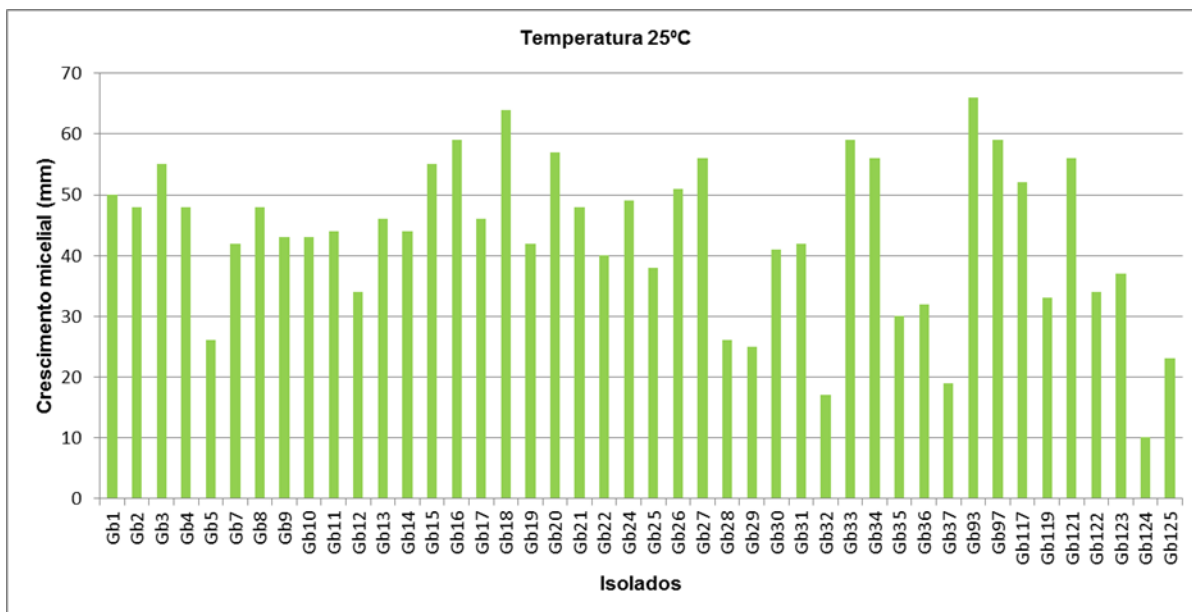


Figura 3.6 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de *Phyllosticta* spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 25°C.

Em relação à temperatura de 30°C, volta-se a verificar um decréscimo no crescimento dos isolados e não se verificou crescimento nos isolados Gb33 e Gb122. O isolado onde se verificou um maior crescimento foi no Gb121 (52 mm) (Figura 3.7).

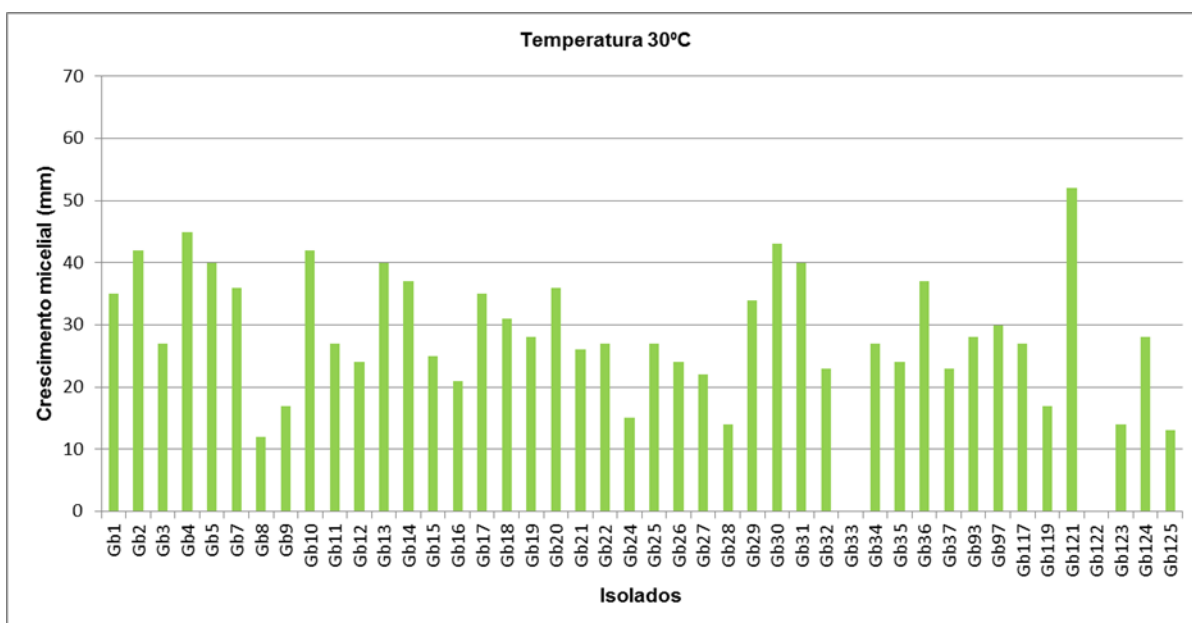


Figura 3.7 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de *Phyllosticta* spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 30°C.

À temperatura de 35°C, o crescimento só foi observado nos isolados Gb117 (1 mm), Gb123 (2 mm) e Gb124 (2 mm) (Figura 3.8).

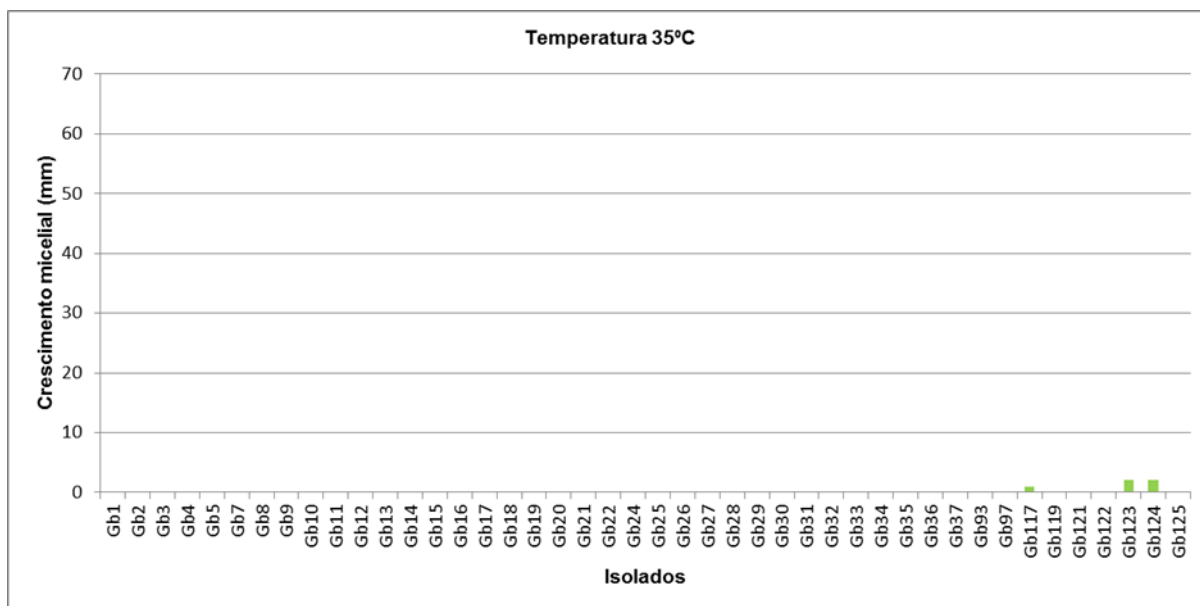


Figura 3.8 – Crescimento micelial (mm) obtido dos 44 isolados de *Phyllosticta* spp. após 10 dias na obscuridade e à temperatura de 35°C.

Para a gama de temperaturas compreendidas entre os 10°C e os 35°C, as curvas de crescimento micelial obtidas para cada isolado, apresentaram uma forma semelhante para a maioria dos isolados de *Phyllosticta* em estudo (Figura 3.9).

A temperatura ótima de crescimento micelial para a maioria dos isolados de *P. ampellicida* foi de 25°C. Atingindo-se para esta temperatura o valor máximo de crescimento micelial para o isolado Gb93 (64 mm) e o valor mínimo para o isolado Gb124 (10 mm). O crescimento micelial médio para o conjunto dos isolados e para o conjunto das temperaturas foi de 29 mm, variando entre os 43 mm (Gb33) e os 12 mm (Gb125), respetivamente.

Os resultados apurados, para a influência da temperatura no crescimento micelial da coleção de isolados em estudo, estão em concordância com as referidas pelos diferentes autores para a espécie *P. ampellicida* (Reddick, 1911; Kuo e Hoch, 1995; Rego e Oliveira, 2007; Kong, 2012). O isolado Gb125, espécie *P. parthenocissi*, não se distinguiu da maioria dos isolados de *P. ampellicida*.

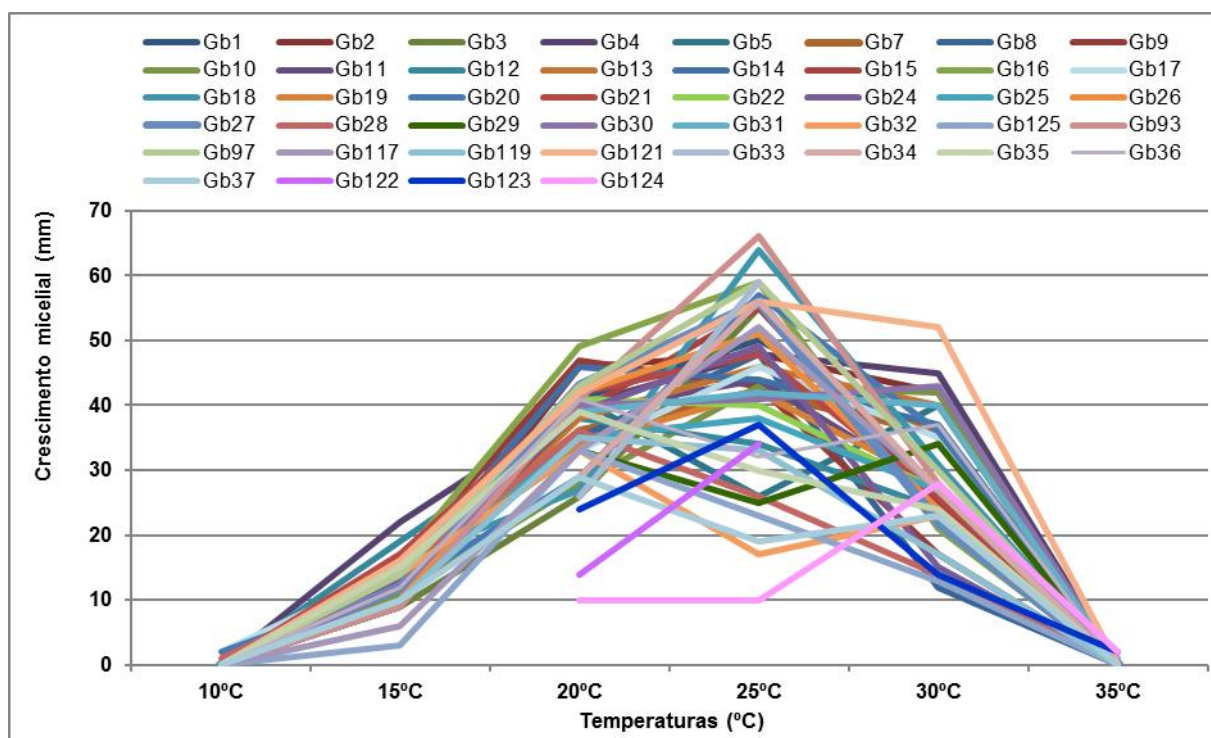


Figura 3.9 – Curvas de crescimento obtidas para o conjunto de 44 isolados de *Phyllosticta* spp. para as diferentes temperaturas estudadas.

Nos Anexos 1 a 6, encontram-se as análises do crescimento dos isolados nas diferentes temperaturas estudadas. Para as temperaturas de 10°C e 35°C, num geral, as diferenças de crescimento entre isolados não são significativas ao contrário das restantes temperaturas onde já se encontram algumas diferenças entre isolados. A origem geográfica dos isolados não aparenta ter grande influência nesta análise, porém a maioria dos isolados nacionais aparenta ter crescimentos maiores que os isolados da Hungria e do Luxemburgo.

3.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POR ISSR-PCR

Com base na análise de agrupamento (UPGMA) de uma matriz de similaridade que foi gerada a partir de dados de ISSR-PCR com os quatro iniciadores, (GA)₈YT, (AG)₈YT, HVH(TG)₇ e (CAG)₅, obteve-se o dendrograma da Figura 3.10. Para este estudo foram utilizados 42 isolados, pois não foi possível fazer a análise dos isolados Gb24 e Gb119.

Através do dendrograma (Figura 3.10) pode observar-se que os isolados se enquadram em dois grandes grupos A e B. O grupo A tem um “bootstrap” de 19% e o grupo B um de “bootstrap” de 35%.

O grupo A divide-se no subgrupo A1 onde ficaram agrupados isolados da Alemanha (Gb97, Gb117 e Gb121), da Hungria (Gb122 e Gb124), da Itália (Gb34, Gb35, Gb36 e Gb37) do

Luxemburgo (Gb93) e um isolado português (Gb32). No subgrupo A2 ficaram agrupados dois isolados, um da Hungria (Gb123) e um da Itália (Gb33). Nos subgrupos A1 e A2 surgem os isolados internacionais com valores de “bootstrap” baixos.

No grupo B surgem dois subgrupos: um com valores de “bootstrap” de 15%, B1 e o subgrupo B2 com valores de “bootstrap” de 76%. No subgrupo B1 ficaram agrupados a maioria dos isolados portugueses exceto os isolados Gb4, Gb8, Gb12, Gb13 e Gb19 os quais ficaram agrupados no subgrupo B2.

O isolado Gb125 surge, como era esperado, num grupo independente, pois de acordo com os estudos entretanto efetuados por outros autores, este isolado pertence à espécie *P. parthenocissi* (Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Dos marcadores utilizados o (CAG)₅, foi o que apresentou maior número de bandas.

Na globalidade, os resultados apontam para uma baixa variabilidade intraespecífica em *P. ampellicida* obtida a partir de *V. vinifera*. Relativamente à origem dos isolados não se pode tirar conclusões pois o número de isolados nacionais é bastante superior ao de isolados internacionais. Contudo, os resultados obtidos são semelhantes aos obtidos por Rinaldi (2013) em que os isolados europeus agrupavam entre si e surgiam separados dos isolados americanos.

Estes resultados teriam de ser confirmados com a utilização de outros marcadores moleculares, tais como os marcadores dos genes de β -tubulina e de calmodulina.

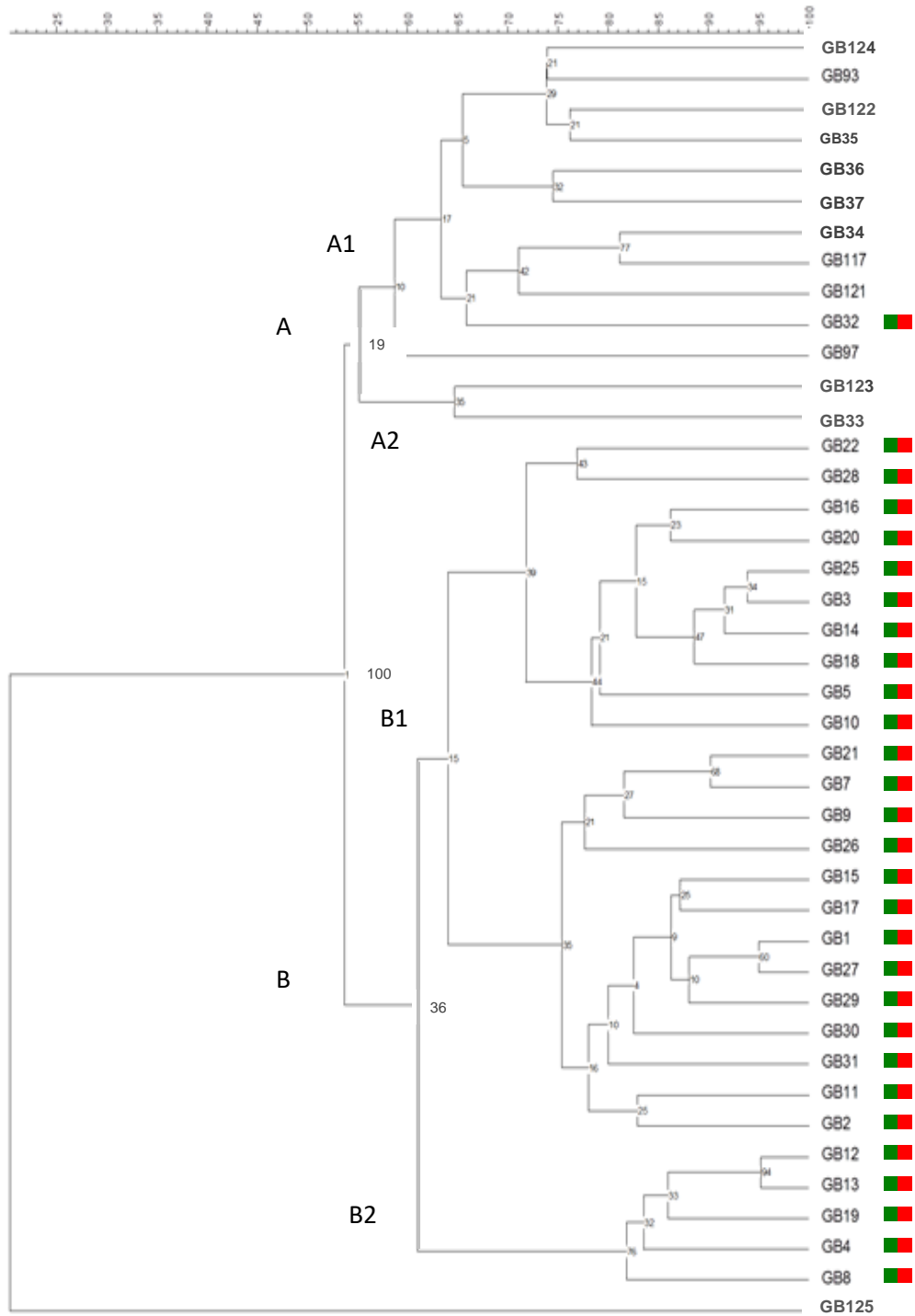


Figura 3.10 – Dendrograma resultante da análise de perfis de ISSR-PCR de 41 isolados de *Phyllosticta ampelici*, produzido por UPGMA sobre uma matriz de similaridade. Em cada nó representam-se os valores percentuais de “bootstrap”; GB, isolados de *Phyllosticta ampelici*; Gb125 – isolado de *Phyllosticta parthenocissi*.

3.4. PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *PHYLLOSTICTA AMPELICIDA* EM VIDEIRA

3.4.1. Sintomas observados

Três meses após a inoculação, as plantas apresentavam necroses alongadas e acastanhadas nos sarmentos (Figura 3.11). Estas necroses desenvolviam-se acima e abaixo do ponto de inoculação e, por vezes, abarcavam a totalidade do pânpano e eram em tudo semelhantes às observadas em sarmentos nas vinhas.



Figura 3.11 – Necroses observadas nos pânpanos inoculados com isolados de *Phyllosticta ampellicida* no estudo de patogenicidade.

3.4.2. Área das necroses nos pânpanos

Todos os isolados nacionais de *P. ampellicida* originaram necroses nos pânpanos de dimensões superiores às presentes na testemunha. A área média das necroses foi de 438 mm² e, em comparação com as testemunhas, o aumento da área das necroses causadas pelas infeções variou entre 56% e 236%, a que corresponde uma área de 246 mm² e de 1033 mm², respetivamente (Figura 3.12).

Tendo em conta os resultados obtidos, verifica-se uma gradação da virulência entre os vários isolados, destacando-se como mais virulentos os isolados Gb24 e Gb32 e como menos virulentos os isolados Gb13, Gb8, Gb123, Gb12, Gb16, Gb4, Gb29, Gb15, Gb37, Gb122, Gb30, Gb124, Gb14, Gb10, Gb36, Gb2, Gb25, Gb97, Gb34, Gb1, Gb125, Gb31 e Gb35 (Figura 3.12).

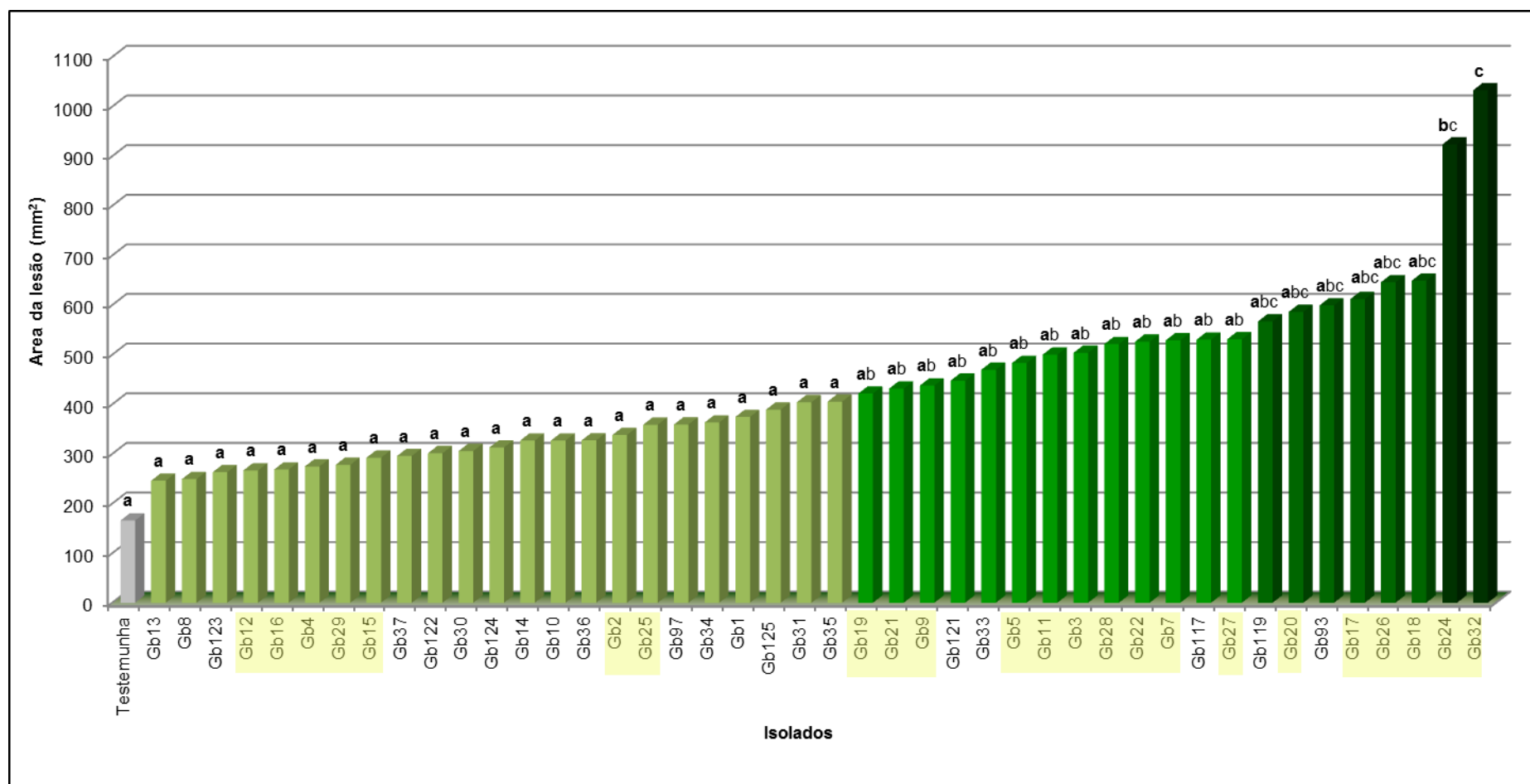


Figura 3.12 – Área das necroses produzidas nos jovens lançamentos das videiras da casta Fernão Pires inoculadas com os 43 isolados de *Phyllosticta ampelici*, um de *Phyllosticta parthenocissi* (Gb125) e a testemunha. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD). Em abcissas, os isolados sombreados a amarelo são isolados nacionais e o sombreado a rosa, o isolado de *Phyllosticta parthenocissi*.

3.4.3. Reisolamentos

O reisolamento do patógeno inoculado foi possível apenas para 24 isolados nacionais e para o isolado de *P. parthenocissi*. Esta ocorrência resultou de vicissitudes várias ocorridas na estufa de campo as quais não interferiram diretamente nos resultados do ensaio que se apresentam.

Ocorreu alguma variação gradual entre os isolados de *P. ampellicida* tendo as percentagens mais elevadas ocorrido para os isolados Gb7, Gb14, Gb18, Gb19 e Gb20. Os menores valores de isolamento ocorreram para os isolados Gb1, Gb15 e Gb125. Relativamente às plantas testemunhas, o patógeno não foi isolado (Figura 3.13).

Nos ensaios de patogenicidade, não se observou uma relação aparente entre a idade dos isolados e a virulência (Figura 3.13).

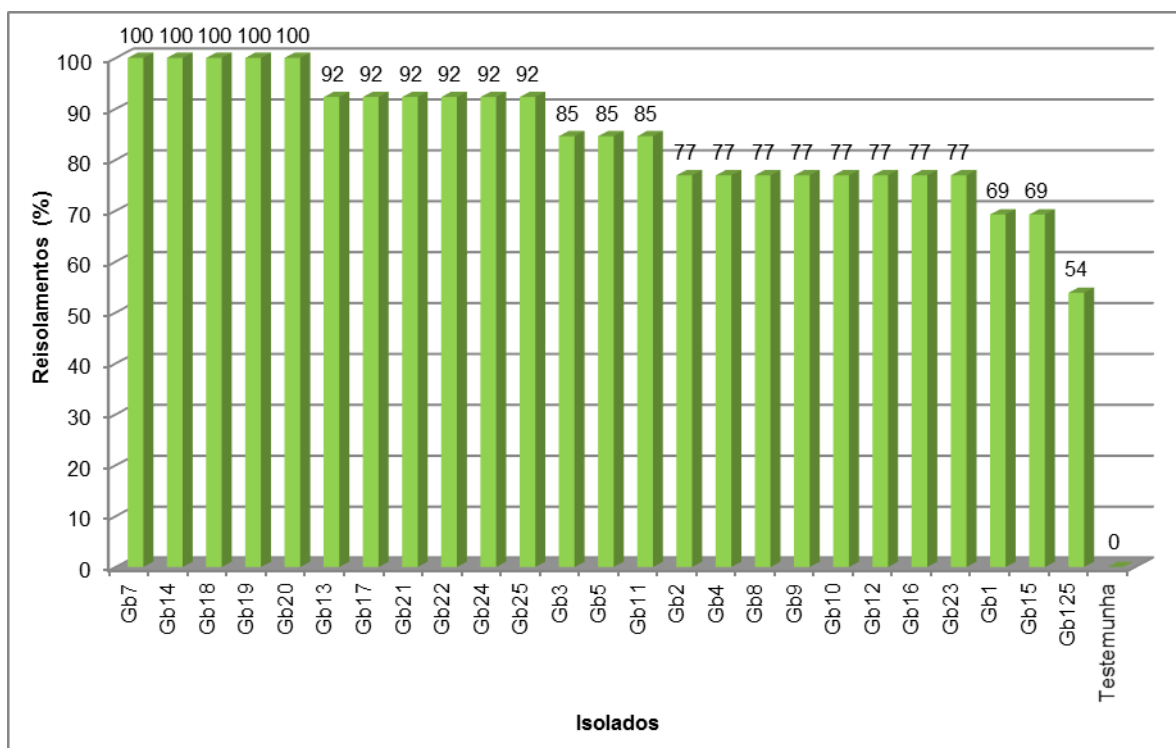


Figura 3.13 – Percentagens médias de reisolamentos, obtidas a partir de plantas de videira da cultivar Fernão Pires inoculadas com 24 isolados de *Phyllosticta ampellicida*, um de *Phyllosticta parthenocissi* e a testemunha.

Quanto aos isolados que demonstraram ser menos virulentos e foram reisolados em menores percentagens, os resultados foram mais heterogêneos, concordando apenas

parcialmente. Relativamente à idade dos isolados constatou-se que não existiu uma relação direta entre esta e a virulência dos isolados. Alguns dos isolados mais antigos foram precisamente os mais virulentos e vice-versa.

Em relação ao local de colheita, e no que diz respeito aos isolados provenientes de diversas regiões vitícolas, os resultados alcançados indicam que isolados com grau de virulência semelhante se distribuem por diversas regiões do País e que, da mesma região, se obtêm resultados diferentes, relativamente à virulência dos isolados, não sendo contudo possível estabelecer uma relação entre eles.

A análise dos resultados dos ensaios de patogenicidade entre isolados obtidos da mesma casta indicou a existência de diferenças de virulência, encontrando-se alguns isolados entre os mais virulentos e outros entre os menos virulentos.

4. CONCLUSÕES

A podridão negra ou “black rot” da videira, causada pelo fungo *Phyllosticta ampellicida* (Englem.) Aa (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz), tem sido assinalada em regiões de clima mediterrânico com temperaturas elevadas e chuvas abundantes durante a primavera e o início do verão. Em 2007, foi identificada em Portugal a partir de folhas e cachos com sintomas provenientes da região da Bairrada. Posteriormente, a doença disseminou-se por diversas regiões vitivinícolas com evidentes prejuízos na produção.

Prospecções efetuadas ao longo de vários anos com a colaboração de várias entidades, permitiram estabelecer uma coleção de 30 isolados de origem nacional e, previamente identificados como *P. ampellicida*. Do intercâmbio com vários países da Europa, obtiveram-se mais 13 isolados europeus que foram adicionados à coleção (Itália, Luxemburgo, Hungria e Alemanha). Incluiu-se ainda um isolado do CBS nº 111645 (Gb125), inicialmente identificado como *P. ampellicida* (isolado de referência) e, posteriormente, reclassificado como sendo da espécie *P. parthenocissi*.

Ao longo desta tese foram estudadas as características culturais, morfológicas e moleculares da coleção. O conjunto das características morfoculturais e moleculares apuradas, para os isolados em estudo confirmou a identificação dos 30 isolados nacionais e dos 13 isolados europeus como pertencentes à espécie *P. ampellicida*. Apenas, as características culturais revelaram algumas diferenças entre o isolado Gb125 (*P. parthenocissi*) e os restantes em estudo da espécie *P. ampellicida*.

Relativamente à análise da variabilidade genética, verificou-se que a maioria dos isolados nacionais surgia num grupo (B1) com exceção, de um pequeno grupo de isolados que formam o grupo B2. A única exceção foi o isolado Gb32 que agrupou com três isolados, dois da Alemanha e um da Itália, o que indica que estará mais próximo destes.

Para a maioria dos isolados, as temperaturas mínima, ótima e máxima de crescimento foram, respetivamente, 10°C, 25°C e 35°C, à exceção de um pequeno grupo de isolados (Gb17, Gb20 e Gb28) que cresceu a 10°C, e dos isolados Gb117, Gb123 e Gb124 que cresceram a 35°C.

Foi também possível confirmar que o isolado inicialmente considerado de referência para a espécie *P. ampellicida*, Gb125, e que posteriormente foi reclassificado como *P. parthenocissi*, surgiu num grupo separado de todos os restantes isolados.

Os resultados apurados nos ensaios de patogenicidade foram limitados embora, tenham

permitido concluir que a totalidade dos isolados de *P. ampellicida* era patogénica para a videira nas condições em que se realizaram os ensaios. O método utilizado para testar a patogenicidade dos isolados permitiu apurar a existência de diferentes escalas de virulência entre isolados da mesma espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht, M., Kortekamp, A. 2009. The *in vitro* effect of the herbicide Basta® (glufosinate ammonium) on potential fungal grapevine pathogens. *European Journal of Horticultural Science*, 74, 112-117.
- Alves, A., Phillips, Alan J.L., Henriques, I., Correia, A. 2007. Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*, 158, 112-121.
- Barlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Sciences*, 58, 694-662.
- Becker, C.M., Pearson, R.C. 1996. Black rot lesions on overwintered canes of *Euvitis* supply conidia of *Guignardia bidwellii* for primary inoculum in the Spring. *Plant Disease*, 80, 24-27.
- Bedir, E., Kirmizipekmez, H., Sticher, O., Calis, I. 2000. Triterpene saponins from the fruits of *Hedera helix*. *Phytochemistry*, 53, 905-909.
- Canaveira, F., Reis, P., Nascimento, T., Rego, C. 2014. *Characterization of Phyllosticta ampellicida isolates of grapevine*. In 1º Simpósio SCAP (Novos Desafios na Protecção de Plantas) e 7ª Congresso da SPF, Oeiras, Portugal, URL: https://www.researchgate.net/publication/294580126_Characterization_of_Phyllosticta_ampellicida_isolates_of_grapevine
- Caltrider, P.G. 1961. Growth and sporulation of *Guignardia bidwellii*. *Phytopathology*, 51, 860-863.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20, 2380.
- DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV>) – consultado a 20/09/2016.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26, 297-302.
- Dubos, B. 1999. *Les maladies cryptogamiques de la vigne: les champignons parasites dès organes herbacés et du bois de la vigne*. Ed. Féret, Bordeaux, 174pp.

- Dufour, R. 2006. Grapes: organic production. ATTRA – National Sustainable Agriculture Information Service.
- Elias, R., Diaz Lanza, AM., Vidal-Olivier, E., Balansard, G., Faure, R., Babadjamian, A. 1991. Triterpenoid saponins from the leaves of *Hedera helix*. *Journal of Natural Products*, 54, 98-103.
- Ellis, M.A. 2008. Grape black-rot. In *Agriculture and Natural Resources*. HYG-3004-08. The Ohio State University, USA.
- Ellis, M.A., Madden, L.V., Wilson, L.L. 1986. Electronic grape black rot predictor for scheduling fungicides with curative activity. *Plant Disease*, 70, 938-940.
- EPPO/OEPP. 2002. Good plant protection practice, grapevine, PP 2/23. *Bulletin EPPO/OEPP* 32, 371-392.
- Fang, D.Q., Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical Applied Genetics*, 95, 408-417.
- Farr, D.F., Bill, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. 1989. *Fungi on plants and plants products in the United States*. St. Paul, MN, USA. APS Press, 1252.
- Ferrin, D.M., Ramsdell, D.C. 1977. Ascospore dispersal and infection of grapes by *Guignardia bidwellii*, the causal agente of grape black rot disease. *Phytopathology*, 67, 1501-1505.
- Ferrin, D.M., Ramsdell, D.C. 1978. Influence of conidia dispersal and environment on infection of grape by *Guignardia bidwellii*. *Phytopathology*, 68, 892-895.
- Funt, R.C., Ellis, M.A., Madden, L.V. 1990. Economic analysis of protectant and disease-forecast-based fungicide spray programs for control of apple scab and grape black rot in Ohio. *Plant Disease*, 74, 638-642.
- Gadoury, D.M. 1993. Integrating management decisions for several pests in fruit production. *Plant Disease*, 77, 299-302.
- Gadoury, D.M., Stensvand, A., Seem, R.C. 1996. A wind tunnel for controlled-environment studies of ascospore release by *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry*, 86, 596-601.
- Galet, P. 1977. *Les maladies et les parasites de la vigne*. Tome 1. Les maladies dues à des végétaux. Montpellier, Imprimerie du Paysan du Midi, 871.

- Gessler, C., Blaise, Ph., Jermini, M. 2005. Black rot of the grape hybrids caused by *Guignardia bidwellii*. In *wprs IOBC Integrated Protection and Production in Viticulture*, 20-21 October, Darfo Boario Terme, Erbusco, Italy (Abst.).
- Gilbert, J.E., Lewis, R.V., Wilkinson, M.J., Caligari, P.D.S. 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical Applied Genetics*, 98, 1125-1131.
- Glienke, C., Pereira, O., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunningham, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species with reference to those associated with citrus black spot. *Persoonia*, 26, 47-56.
- Güçlü-Üstündağ, Ö., Mazza, G. 2007. Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231-258.
- Harms, M., Holz, B., Hoffmann, C., Lipps, H.-P., Silvanus, W. 2005. Occurrence of *Guignardia bidwellii*, the causal agent of black rot on grapevine, in the vine growing areas of Rhineland-Palatinate, Germany. In *International Symposium on Introduction and Spread of Invasive Species*, 9-11 June, Humboldt University, Berlin, Germany.
- Hawksworth, D.L., Crous, P.W., Redhead, S.A., Reynolds, D.R., Samson, R.A., *et al.* 2011. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus*, 2, 105-112.
- Hesler, L.R., Whetzel, H.H. 1917. Black rot, caused by *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala and Ravaz. In *Manual of fruit diseases*. Bailey LH, ed. New York: Macmillan. 462 pp.
- Hoffman, L.E., Wilcox, W.F. 2002. Utilizing epidemiological investigations to optimize management of grape black rot. *Phytopathology*, 92, 676-680.
- Hoffman, L.E., Wilcox, W.F. 2003. Factor influencing the efficacy of myclobutanil and axoxystrobin for control of grape black rot. *Plant Disease*, 87, 273-281.
- Hoffman, L.E., Wilcox, W.F., Gadoury, D.M., Seem, R.C. 2002. Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length. *Phytopathology*, 92, 1068-1076.
- Jailloux, F. 1992. *In vitro* production of the teleomorph of *Guignardia bidwellii*, causal

- agent of black rot of grapevine. *Canadian Journal of Botany*, 70, 254-257.
- Janex-Favre, M.C., Parguey-Leduc, A., Jailloux, F. 1996. The ontogeny of perithecia in *Guignardia bidwellii*. *Mycological Research*, 100, 875-880.
- Jermini, M., Gessler, C. 1996. Epidemiology and control of grape black rot in southern Switzerland. *Plant Disease*, 80, 322-325.
- Koch, E., Enders, M., Ullrich, C.I., Molitor, D., Berkelmann-Löhnertz, B. 2013. Effect of *Primula* root and other plant extracts on infection structure formation of *Phyllosticta ampellicida* (asexual stage of *Guignardia bidwellii*) and on black rot disease of grapevine in the greenhouse. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120, 26-33.
- Kong, G. 2012. *Diagnostic methods for black rot of grapes – Guignardia bidwellii*. PaDIL – Plant Biosecurity Toolbox.
- Kuo, K.C., Hoch, H.C. 1995. Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings, and appressoria of *Phyllosticta ampellicida*. *Mycologia*, 87, 759-771.
- Kuo, K.C., Hoch, H.C. 1996. The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. *Mycologia*, 88, 626-634.
- Loskill, B., Molitor, D., Koch, E., Harms, M., Berkelmann-Löhnertz, B., Hoffmann, C., Kortekamp, A., Porten, M., Louis, F., Maixner, M. 2009. *Strategien zur regulation der schwarzfäule (Guignardia bidwellii) im ökologischen Weinbau. Schlussbericht.*(in Molitor, Beyer, 2014).
- Luttrell, E.S. 1974. Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia*, 66, 1-15.
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H. 2012. *International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. Eds. Koeltz Scientific Books. ISBN 978-3-87429-425-6.
- Miessner, S., Mann, W., Stammier, G. 2011. *Guignardia bidwellii*, the causal agent of grape black rot on grapevine has a low risk for Q_oI resistance. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118, 51-53.

- Miller, J.W. 1968. Black rot of grape. *Plant Pathology Circular* 76. Gainesville: Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 2.
- Molitor, D. 2009. *Biologie und bekämpfung der schwarzfäule* (*Guignardia bidwellii*) *an weinreben*. Dissertation, Geisenheimer Berichte Bd. 65. Gesellschaft zur Förderung der Forschungsanstalt Geisenheim, Geisenheim. (in Molitor *et al.*, 2011).
- Molitor, D. 2012. Black rot: epidemiology and control strategies in integrated and organic viticulture. In *Jornada Técnica Podridão Negra da Videira*, Viseu, 24 de Maio de 2012,,pp. 16.
- Molitor, D., Berkemann-Loehnertz, B. 2011. Simulating the susceptibility of clusters to grape black rot infections depending on their phenological development. *Crop Protection*, 30, 1649-1654.
- Molitor, D., Beyer, M. 2014. Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications – a review. *Annals of Applied Biology*, ISSN 0003-4746, 1-13.
- Molitor, D., Heibertshausen, D., Baus, O., Loskill, B., Maixner, M., Berkemann-Löhnertz, B. 2010. Einsatz eines *Sapindus mukorossi* -extraktes zur regulierung von pilzlichen pathogenen an weinreben – eine alternative für den ökologischen rebschutz? *Journal für Kulturpflanzen*, 444-450. (in Molitor e Beyer, 2014).
- Molitor, D., Baus, O., Berkemann-Lohnertz, B. 2011. Protective and curative grape black rot control potencial of pyraclostrobin and myclobutanil. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118, 161-167.
- Molitor, D., Fruehauf, C., Baus, O., Berkemann-Loehnertz, B. 2012. A cumulative degree-day-based model to calculate the duration of the incubation period of *Guignardia bidwellii*. *Plant Disease*, 96, 1054-1059.
- Mostert, L., Crous, P.W., Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*, 52, 46-58.
- Mugnai, L. 2012. Black rot: a new and worring disease of grapevine in Italy. In *Jornada Técnica Podridão Negra da Videira*, Viseu, 24 de Maio de 2012, 22-25.

- Müller, A., Ganzera, M., Stuppner, H., 2006. Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 112, 218-223.
- Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 76, 5269-5273.
- Northover, P.R. 2008. *Factors influencing the infection of cultivated grape (Vitis spp. Section Euvitis) shoot tissue by Guignardia bidwellii (Ellis) Viala & Ravaz*. Ph.D. Thesis. Pennsylvania State University.
- Northover, P.R., Travis, J.W. 1998. Infection requirements of *Guignardia bidwellii* conidia on grapevine shoots. *Phytopathology*, 88, S68.
- Prates, A. 2012. Black rot – proteção fitossanitária, produtos autorizados (aspectos gerais) e estratégia de produção. In *Jornada Técnica Podridão Negra da Videira*, Viseu, 24 de Maio de 2012, 19-21.
- Pezet, R., Jermini, M. 1989. Le black rot de la vigne: symptômes, epidemiologie et lutte. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture*, 21, 27-34.
- Ramsdell, D.C., Milholland, R.D. 1988. Black rot. In. *Compendium of Grape Diseases*. APS, ed., APS Press, St Paul, USA, 15-17.
- Rayner, R.W. 1970. *A mycological colour chart*. CAB International Mycological Institute, Kew, and British Mycological Society, 34 pp.
- Reddick, D. 1911. *The black rot disease of grapes*. Cornell University Bulletin 293. Ithaca, NY, USA, Cornell University.
- Rego, C., Oliveira, H. 2007. "Black rot" da videira causado por *Guignardia bidwellii*. In *Livro de Actas do 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, 23 a 25 de Maio, Évora, 107-114.
- Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Reis, P. 2012. Caracterização fenotípica, molecular e patogenicidade de isolados de *Guignardia bidwellii*. *Caderno Técnico nº1, Black rot, a podridão negra da videira*, Sustinia, 4-11.
- Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Reis, P. 2012b – Podridão Negra da Videira:

- Caracterização fenotípica, molecular e patogenicidade de isolados de *Guignardia bidwellii*. *Jornada Técnica Podridão Negra da Videira*, Viseu, 24 de Maio de 2012, URL:https://www.researchgate.net/profile/Cecilia_Rego/publications?sorting=newest&page=2
- Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., Töpfer, R. 2011. *Etablierung einer method zur phänotypisierung der schwarzfäule (Guignardia bidwellii) resistens in der Weinrebe (Vitis spec.)*.
- Ries, S.M. 1999. *Black rot of grape*. RPD N° 703. Integrated Pest Management, University of Illinois Extension.
- Rinaldi, P., Broggin, G.A.L., Gessler, C., Molitor, D., Sofia, J., Mugnai, L. 2013a. *Guignardia bidwellii*, the agent of grape black rot of grapevine, is spreading in European vineyards. In *Book of abstracts of 10th International Congress of Plant Pathology (ICPP 2013)*..
- Rinaldi, P., Skavantzou, M., Rossi, M., Comparini, C., Sofia, J., Molitor, D., Mugnai, L. 2013b. *Guignardia bidwellii*. Epidemiology and symptoms development in Mediterranean environment. *Journal of Plant Pathology*, 95, S1.83-S1.84.
- Rinaldi, P. 2015. *Genetic variability of Phyllosticta ampellicida (syn. Guignardia bidwellii), causal agent of black rot of grapevine*. PhD final thesis. Italy, 92 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1695.
- Schildberger, B., Mehofer, M., Griessbacher, A. 2013. Controlling black rot (*Guignardia bidwellii*) and determination of its mycotoxins. *Journal of Plant Pathology*, 95, S1.82.
- Schönbeck, F., Schlösser, E. 1976. *Preformed substances as potential protectants*. In Heitefuss R & Williams PH (eds.): *Physiological Plant Pathology*. Encyclopedia of Plant Pathology, New Series, Vol. 4. Springer, Berlin, Heidelberg. 653-678.
- Scribner, F.L. 1886. *Report on the fungus diseases of the grapevine*. Washington Government Printing Office, Washington.
- Scribner, F.L., Viala, P. 1888. *Black rot (Laestadia bidwellii)*. Department of Agriculture Botanical Division, Bulletin 7.

- Shaw, B.D., Carroll, G.C., Hoch, H.C. 2006. Generality of the prerequisite of conidium attachment to a hydrophobic substratum as a signal for germination among *Phyllosticta* species. *Mycologia*, 98, 186-194.
- Shaw, B.D., Hoch, H.C. 2000. Ca²⁺ regulation of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospore germination and appressorium formation. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 43-53.
- Sofia, J., Neves, M. 2012. A doença nas regiões do Dão e Bairrada. In *Jornada Técnica Podridão Negra da Videira*, Viseu, 24 de Maio de 2012, 34-36.
- Sosnowski, M., Kong, G., Wilcox, W. 2011. *Diagnostic protocol for Guignardia bidwellii (black rot on grapevine)*. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Australia.
- Sosnowski, M.R., Emmett, R., Wilcox, W.F., Wicks, T. 2012. Eradication of black rot (*Guignardia bidwellii*) from grapevine by drastic pruning. *Plant Pathology*, 61, 1093-1102.
- Spotts, R.A. 1977a. Chemical eradication of grape black rot caused by *Guignardia bidwellii*. *Plant Disease Reporter*, 61, 1093-1102.
- Spotts, R.A. 1977b. Effect of leaf wetness duration and temperature on the infectivity of *Guignardia bidwellii* on grape leaves. *Phytopathology*, 67, 1378-1381.
- Spotts, R.A. 1979. Use of Bay Med-6447 for eradication of black rot caused by *Guignardia bidwellii*. *Plant Disease Reporter*, 63, 934-969.
- Spotts, R.A. 1980. Infection of grape by *Guignardia bidwellii* – factors affecting lesion development, conidial dispersal and conidial populations on leaves. *Phytopathology*, 70, 252-255.
- Sultan, A., Johnston, P.R., Park, D., Robertson, A.W. 2011. Two new pathogenic ascomycetes in *Guignardia* and *Rosenscheldiella* on New Zealand's pygmy mistletoes (Korthalsella: Viscaceae). *Studies in Mycology*, 68, 237-247.
- Talhinhas, P., Neves-Martins, J., Leitão, J. 2003. AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breeding*, 122, 507-510.
- Tomoiaga, L., Comsa, M. 2010. The strategy of optimization for combat the black rot of vine (*Guignardia bidwellii*), in the ecoclimatic conditions from vineyard Târnave. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-*

- Napoca. *Horticulture*: 67, 500.
- Travis, J.W., Saunders, M., Hed, B., Muza, A., Timer, J., Wilcox, W.F. 2007. *Integrated management of organic concord grape production in the Lake Erie region*. Final Report to the New York Wine/Grape Foundation.
- Ullrich, C.I., Kleepies, R.G., Enders, M., Koch, E. 2009. Biology of black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*. *Journal fur Lulturflanzen*, 61, 82-90.
- van der Aa, H.A. 1973. Studies in *Phyllosticta* I. *Studies in Mycologia*, 5, 1-110.
- Viala, P., Ravaz, L. 1886. Mémoire sur une nouvelle maladie de la vigne, le black rot (pourriture noir). *Annales de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique Montpellier*, 2, 17-58.
- Wicht, B., Petrini, O., Jermini, M., Gessler, C., Broggini, G.A.L. 2012. Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete *Guignardia bidwellii*, agent of grape black rot. A polyphasic approach to fungal identification. *Mycologia*, 104, 1036-1045.
- Wilcox, W.F., Riegel, D.G. 1997. Evaluation of fungicides programs for control of grape black rot of grapes, 1996. *Fungicide and Nematicide Tests*, 52, 874.
- Wilcox, W.F., Riegel, D.G., Emele, L.R. 1999. Evaluation of fungicide programs for control of grape black rot, 1998. *Fungicide and Nematicide Tests*, 54, 110.
- Wilkee, S., Lombard, L., Udayanga, D., Crous, P.W., Chukeatirote, E., McKenzie, E.H.C., Bahkali, A.H., Dai, D.Q., Hyde, K.D. 2011. *Phyllosticta* – an overview of current status of species recognition. *Fungal Diversity*, 51, 43-61.
- Wilkee, S., Lombard, L., Nakashima, C., Motohashi, K., Chukeatirote, E., Cheewangkoon, R., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Crous, P.W. 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). *Studies in Mycology*, 76, 1-29.
- Wong, M.H., Crous, P.W., Henderson, J., Groenewald, J.Z., Drenth, A. 2012. *Phyllosticta* species associated with freckle disease of banana. *Fungal Diversity*, 56, 173-187.
- Zhang, K., Zhang, N., Cai, L. 2013. Typification and phylogenetic study of *Phyllosticta ampelcida* and *P. vaccinii*. *Mycologia*, 105, 1030-1042.
- Zhou, S., Smith, D.R., Stanosz, G.R. 2001. Differentiation of Botryosphaeria species and

related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research*, 105, 919-926.

6. ANEXOS

Anexo 1 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 10°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).

Gb1	0,000000	a		
Gb2	0,000000	a		
Gb3	0,000000	a		
Gb4	0,000000	a		
Gb5	0,000000	a		
Gb7	0,000000	a		
Gb8	0,000000	a		
Gb9	0,000000	a		
Gb10	0,000000	a		
Gb11	0,000000	a		
Gb124	0,000000	a		
Gb13	0,000000	a		
Gb14	0,000000	a		
Gb15	0,000000	a		
Gb16	0,000000	a		
Gb123	0,000000	a		
Gb18	0,000000	a		
Gb19	0,000000	a		
Gb122	0,000000	a		
Gb21	0,000000	a		
Gb22	0,000000	a		
Gb24	0,000000	a		
Gb125	0,000000	a		
Gb26	0,000000	a		
Gb27	0,000000	a		
Gb121	0,000000	a		
Gb29	0,000000	a		
Gb30	0,000000	a		
Gb31	0,000000	a		
Gb32	0,000000	a		
Gb33	0,000000	a		
Gb34	0,000000	a		
Gb35	0,000000	a		
Gb36	0,000000	a		
Gb37	0,000000	a		
Gb93	0,000000	a		
Gb97	0,000000	a		
Gb117	0,000000	a		
Gb119	0,000000	a		
Gb25	0,400000	a	b	
Gb12	0,400000	a	b	
Gb28	1,200000	a	b	c
Gb17	1,800000		b	c
Gb20	2,400000			c

Anexo 2 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 15°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).

Gb122	0,00000	a					
Gb124	0,00000	a					
Gb34	0,00000	a					
Gb123	0,00000	a					
Gb33	0,00000	a					
Gb125	3,60000	a	b				
Gb117	6,00000	a	b	c			
Gb3	8,60000	a	b	c	d		
Gb93	9,00000	a	b	c	d		
Gb1	9,00000	a	b	c	d		
Gb119	9,80000	a	b	c	d	e	
Gb26	10,40000		b	c	d	e	
Gb37	10,60000		b	c	d	e	
Gb2	11,60000		b	c	d	e	
Gb22	11,80000		b	c	d	e	
Gb9	11,80000		b	c	d	e	
Gb15	11,80000		b	c	d	e	
Gb25	11,80000		b	c	d	e	
Gb11	11,80000		b	c	d	e	
Gb8	12,00000		b	c	d	e	
Gb30	12,00000		b	c	d	e	
Gb20	12,00000		b	c	d	e	
Gb5	12,20000		b	c	d	e	
Gb36	12,20000		b	c	d	e	
Gb10	12,40000		b	c	d	e	f
Gb13	12,40000		b	c	d	e	f
Gb27	12,60000		b	c	d	e	f
Gb24	13,20000		b	c	d	e	f
Gb7	13,20000		b	c	d	e	f
Gb14	13,60000			c	d	e	f
Gb97	13,80000			c	d	e	f
Gb32	14,00000			c	d	e	f
Gb29	14,20000			c	d	e	f
Gb28	14,40000			c	d	e	f
Gb19	14,60000			c	d	e	f
Gb35	15,00000			c	d	e	f
Gb31	15,40000			c	d	e	f
Gb17	15,40000			c	d	e	f
Gb18	15,60000			c	d	e	f
Gb121	16,00000				d	e	f
Gb16	16,40000				d	e	f
Gb21	17,20000				d	e	f
Gb12	19,60000					e	f
Gb4	22,20000						f

Anexo 3 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 20°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).

[illegible]

Anexo 4 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 25°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).

[illegible]

Anexo 5 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 30°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).

[illegible]

Anexo 6 - Análise do crescimento dos isolados na temperatura de 35°C. Os valores médios afetados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD).

Gb1	0,000000	a	
Gb2	0,000000	a	
Gb3	0,000000	a	
Gb4	0,000000	a	
Gb5	0,000000	a	
Gb7	0,000000	a	
Gb8	0,000000	a	
Gb9	0,000000	a	
Gb10	0,000000	a	
Gb11	0,000000	a	
Gb12	0,000000	a	
Gb13	0,000000	a	
Gb14	0,000000	a	
Gb15	0,000000	a	
Gb16	0,000000	a	
Gb17	0,000000	a	
Gb18	0,000000	a	
Gb19	0,000000	a	
Gb20	0,000000	a	
Gb21	0,000000	a	
Gb22	0,000000	a	
Gb24	0,000000	a	
Gb25	0,000000	a	
Gb26	0,000000	a	
Gb27	0,000000	a	
Gb28	0,000000	a	
Gb29	0,000000	a	
Gb30	0,000000	a	
Gb31	0,000000	a	
Gb32	0,000000	a	
Gb33	0,000000	a	
Gb122	0,000000	a	
Gb35	0,000000	a	
Gb36	0,000000	a	
Gb37	0,000000	a	
Gb93	0,000000	a	
Gb97	0,000000	a	
Gb121	0,000000	a	
Gb119	0,000000	a	
Gb125	0,000000	a	
Gb34	0,600000	a	b
Gb117	1,000000		b
Gb123	1,800000		c
Gb124	2,400000		c